



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Participación del péptido  $\beta$ -amiloide en la modulación de la  
vía Insulina/PI3K en terminales sinápticas.

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:  
LIBB. HORACIO DAVID HERAS SANDOVAL

TUTORA PRINCIPAL  
DRA. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
BIOMÉDICAS.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
DRA. LOURDES MASSIEU TRIGO, INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR.  
DRA. MARÍA CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
BIOMÉDICAS.

MÉXICO, D.F. DICIEMBRE 2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

la gran proeza  
la gran hazaña  
de la memoria  
es olvidarlo todo.

Mario Benedetti

## **A la Vida, Dios, la Totalidad.**

A **Jazmin**, mi amada esposa por su amor y apoyo incondicional.

A mis dos amadas hijas, **Abril y Ximena**, por venir a darle luz y bendiciones a nuestras vidas.

A mis padres, **Ángeles y Armando**, y hermanos: **Maura, Oscar, y Angie**. Su amor y apoyo incondicional me bastan. También los amo.

A la **Dra. Clorinda Arias** por su apoyo, consejos y paciencia infinitos. Especialmente por darme la suficiente libertad de conducir el proyecto de investigación, sin dejar de señalarme mis errores o debilidades. También por el apoyo y comprensión de mis necesidades familiares, aún a pesar de las exigencias de la academia. No tengo palabras para agradecerle.

A Patricia Ferrera por su apoyo técnico y también por su gran paciencia para enseñarme los “usos y costumbres” del laboratorio.

A la Dra. Angélica Zepeda, quien se integró al laboratorio, contribuyendo con su análisis crítico de mi proyecto y mis presentaciones.

A todos los amigos: los biomédicos de mi generación y de otras (arriba y abajo), biólogos, químicos, QFBs, médicos, muchos de ellos miembros del laboratorio, y muchos más de la UNAM, UAM y COLMEX. Sin su compañía, ayuda, consejos, enseñanzas, alegrías, y en fin convivencia, el trabajo dentro del laboratorio no hubiera sido memorable. Los recuerdo a todos con mucho cariño y les agradezco mucho por compartir esta experiencia conmigo. Disculpen si no los nombro a todos, la lista sería muy larga.

### **Agradezco de manera especial a:**

Mi **comité tutor**: la Dra. Lourdes Massieu y la Dra. Cristina Fernández. Sus aportaciones a la conclusión de éste trabajo, semestre tras semestre, fueron muy importantes. Gracias.

A la Dra. Cristina Fernández, al Dr. Ignacio Camacho, al Dr. Julio Morán y al Dr. Rolando Hernández, por la revisión y corrección de ésta tesis.

Al CONACyT por la beca que sustentó mis estudios de posgrado (CONACyT- 217779).

**A la UNAM, mi agradecimiento es completo.**

## ÍNDICE

1. <i>Resumen.</i> -----	8
2. <i>Abstract.</i> -----	9
3. <i>Introducción.</i> -----	10
4. <i>Enfermedad de Alzheimer.</i> -----	12
4.1. <i>Neuropatología en la enfermedad de Alzheimer.</i> -----	15
4.2. <i>Participación del péptido <math>\beta</math>-amiloide en la disfunción sináptica.</i> -----	17
4.3. <i>Principales factores de riesgo para desarrollar enfermedad de Alzheimer.</i> -----	19
5. <i>Cascada de señalización Insulina/PI3K.</i> -----	21
5.1. <i>Efectos derivados de la activación de Akt en la vía Insulina /PI3K.</i> -----	23
5.2. <i>Modulación de la vía Insulina/PI3K.</i> -----	24
6. <i>Vía de la Insulina/PI3K en el cerebro.</i> -----	26
6.1. <i>La vía de señalización Insulina/PI3K en la función sináptica.</i> -----	29
6.2. <i>Algunos factores que modulan la función de la vía Insulina/PI3K en el cerebro.</i> ---	31
7. <i>Relación entre la vía Insulina/PI3K y el péptido <math>\beta</math>-amiloide.</i> -----	32
8. <i>Planteamiento del Problema.</i> -----	34
9. <i>Hipótesis.</i> -----	35
10. <i>Objetivo general.</i> -----	35
10.1. <i>Objetivos particulares.</i> -----	35
11. <i>Métodos.</i> -----	36
11.1. <i>Obtención de sinaptosomas.</i> -----	36
11.2. <i>Evaluación de la función mitocondrial en sinaptosomas.</i> -----	37
11.3. <i>Técnica de Western blot.</i> -----	37
11.4. <i>Análisis estadístico.</i> -----	38
12. <i>Resultados.</i> -----	39
12.1. <i>Efectos de la insulina y el péptido <math>\beta</math>-amiloide sobre la actividad mitocondrial.</i> ---	39
12.2. <i>La insulina activa la vía PI3K/Akt en terminales presinápticas.</i> -----	40
12.3. <i>Efectos del péptido <math>\beta</math>-amiloide sobre la activación del SRI-1 y Akt.</i> -----	42

<b>12.4. Evaluación de la activación de SRI-1 y Akt en sinaptosomas preincubados con insulina o péptido <math>\beta</math>-amiloide.</b>	<b>42</b>
<b>13. <i>Discusión.</i></b>	<b>44</b>
<b>14. <i>Conclusiones.</i></b>	<b>49</b>
<b>15. <i>Referencias.</i></b>	<b>50</b>
<b>16. <i>Artículos Publicados.</i></b>	<b>73</b>

## Lista de abreviaturas y glosario.

<b>AD</b>	Alzheimer's Disease, en inglés.
<b>Akt</b>	Cinasa Akt, por la cepa de ratón (Ak) en la que se aisló un virus transformante. Cinasa PKB.
<b>AMP</b>	Mono fosfato de adenosina.
<b>BAD</b>	Bcl2 associated death promoter, en inglés. Promotor de muerte asociado a Bcl2.
<b>Bcl2</b>	B cell lymphoma 2, en inglés. Proteína 2 de linfoma de célula B.
<b>CA1</b>	<i>Cornu ammonis</i> , en latín. Cuerno de Amón. Área CA1 en el hipocampo.
<b>EA</b>	Enfermedad de Alzheimer.
<b>FOXO</b>	Miembros de la familia de factores de transcripción de la caja forkhead (Forkhead box, FOX) clasificados de la clase A a la R. La clase O (FOXO) es regulada por la vía PI3K.
<b>GMP</b>	Mono fosfato de guanosina.
<b>IRS-1</b>	Insulin receptor substrate, en inglés. Sustrato del receptor de insulina 1.
<b>JNK</b>	Cinasas c-Jun N-terminal.
<b>MAP1B</b>	Microtubule associated protein 1B, en inglés. Proteína 1B asociada a microtúbulos.
<b>mTOR</b>	Cinasa de mamífero blanco de la rapamicina.
<b>p70S6K</b>	Cinasa de la proteína ribosomal S6.
<b>PI3K</b>	Phosphatidyl Inositol 3 kinase, en inglés. Cinasa de 3-fosfoinositidos.
<b>PKB</b>	Cinasa de proteínas B.
<b>PKCθ</b>	Cinasa de proteínas C theta.
<b>RAPTOR</b>	Regulatory associated protein of mTOR, siglas en inglés. Proteína reguladora asociada a mTOR.
<b>Rheb</b>	Ras homolog enriched in brain, en inglés. Proteína homóloga de Ras enriquecida en cerebro.

<b>RI</b>	Receptor de insulina.
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico.
<b>SH2</b>	Sitio 2 homólogo de Src.
<b>Src</b>	Familia de cinasas homologas a la proteína del virus oncogénico del sarcoma de Rous.
<b>SRI-1</b>	Sustrato del receptor de insulina 1.
<b>TSC1</b>	Proteína 1 de esclerosis tuberosa.
<b>TSC2</b>	Proteína 2 de esclerosis tuberosa.
<b>βA</b>	Péptido β-amiloide.



## 1. Resumen.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal causa de demencia en el mundo, y su principal factor de riesgo es el envejecimiento. La pérdida sináptica se relaciona estrechamente con la disminución progresiva de la memoria como consecuencia de la EA. El péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A), uno de los principales marcadores de la enfermedad de Alzheimer y sus especies oligoméricas contribuyen al daño en las terminales sinápticas. Por otro lado, se sabe que la insulina participa en procesos de plasticidad sináptica a través de la activación del receptor de insulina (RI) y la vía de señalización de la cinasa de fosfoinositidos (PI3K), y que bajas concentraciones de  $\beta$ A, así como de sus especies oligoméricas, modulan de manera aberrante la función del RI en cultivos neuronales. El principal objetivo de este trabajo fue el evaluar la interacción entre el  $\beta$ A y la insulina en las terminales sinápticas de cerebro de rata Wistar, al estudiar el efecto de la insulina y el  $\beta$ A sobre la activación de la vía Insulina/PI3K en sinaptosomas de cerebro de rata. Los resultados muestran que la insulina estimula la actividad mitocondrial y la fosforilación de las proteínas SRI-1 y Akt en sinaptosomas de corteza e hipocampo de rata. Por otro lado, el péptido  $\beta$ A antagoniza los efectos de la insulina; sin embargo, la insulina no puede contrarrestar los efectos del  $\beta$ A. Estos resultados muestran que el  $\beta$ A puede reducir la respuesta a la insulina. Lo anterior, en conjunto con evidencia que apunta a que la desensibilización a la insulina puede incrementar el riesgo de desarrollar EA, sugiere que uno de los eventos que altera el funcionamiento de las sinapsis en la enfermedad de Alzheimer son los cambios en la sensibilidad a la insulina debidos a la excesiva producción del  $\beta$ A.

## 2. Abstract.

Alzheimer disease (AD) is the main dementia worldwide, being the main risk factor ageing. Synaptic loss is correlated with progressive memory reduction due to AD. Amyloid- $\beta$  peptide ( $A\beta$ ) is one of the main molecular hallmarks of AD and its diffusible oligomeric species contribute to synaptic terminal endings susceptibility. Furthermore, insulin is well documented to participate in synaptic plasticity processes through the activation of its receptor (IR) and PI3K pathway and that low levels of  $A\beta$ , as well as its oligomeric species, aberrantly modulate IR function in neuronal cultures. The principal purpose of the present work was to evaluate  $A\beta$  and insulin interplay in AD pathology, by evaluating insulin and  $A\beta$  effects on IR/PI3K pathway activation in synaptosomes. Results shown here demonstrate that insulin stimulates mitochondrial activity and phosphorylation of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) adapter protein and Akt kinase on hippocampus and cortex synaptosomes isolated from rat's brain. Also  $A\beta$  antagonize insulin's effects but insulin can't antagonize  $A\beta$  effects. Thus these results show that  $A\beta$  can reduce insulin sensitivity. Finally in addition to evidence that insulin desensitization can increase the risk for develop AD, these results suggest that one important mechanism that alters synaptic maintenance in AD start with  $\beta A$  induced changes in insulin sensitivity.

### **3. Introducción.**

En México, y el resto del mundo, la expectativa de vida ha aumentado de manera sorprendente. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que entre 2000 y 2050, la proporción de los habitantes del planeta mayores de 60 años de edad se duplicará de 605 millones a 2000 millones (del 11% al 22%) en el transcurso de medio siglo, mientras que el número de mayores de 80 años de edad será de alrededor de 395 millones (4 veces más respecto del año 2000).

El cambio demográfico será más rápido e intenso (menos de 25 años) en los países de ingresos bajos y medianos, que el cambio ocurrido en los países desarrollados, que fue en alrededor de 100 años. Según la Oficina del Censo de Estados Unidos, México será un país de ancianos en 2050, de un estimado de 140 millones de habitantes habrá 36 millones de habitantes con 60 años de edad, cifra estimada mayor al número de jóvenes (27.9 millones) para el mismo año.

Este aumento en la esperanza de vida ha traído consigo la aparición de una variedad de enfermedades crónico-degenerativas asociadas con el envejecimiento, pues es frecuente que las personas mayores padezcan varios problemas de salud al mismo tiempo, como cáncer, demencia, diabetes, cardiopatías, y mueran como consecuencia de éstas.

De estas enfermedades, las demencias llaman especialmente la atención por el impacto que tiene sobre los individuos que la presentan, ya que su identidad se empieza a diluir, convirtiendo a quien la padece en un ser dependiente. El riesgo de padecer demencia aumenta considerablemente con la edad, y se calcula que entre un 25% y un 30% de las personas de 85 años de edad, o más, padecen cierto grado de deterioro cognoscitivo.

Para México el caso es preocupante ya que, según la OMS, la demencia afecta particularmente a personas que viven en países con ingresos medios o bajos (58%), una proporción que aumentará en un 25% debido a la cada vez mayor longevidad en naciones emergentes para el año 2050, según la OMS. También es preocupante que en los países de ingresos bajos y medianos los ancianos aquejados de demencia, por lo general, no tengan acceso a la atención requerida, siendo la familia quien absorba los cuidados y gastos generados, sin recibir ayuda gubernamental por cuidar de estos pacientes en casa o en las llamadas casas de día.

La demencia es un síndrome, generalmente crónico, que provoca un deterioro de las funciones cognitivas mayor al causado normalmente por el envejecimiento. El padecimiento afecta la memoria, el razonamiento, la orientación, la comprensión, el cálculo, la capacidad de aprendizaje, el lenguaje, el comportamiento y la aptitud de realizar las actividades cotidianas. Así, a medida que las personas vivan más tiempo, en todo el mundo se producirá un aumento en la cantidad de casos de demencia, de las cuales la enfermedad de Alzheimer es la más común.

#### 4. Enfermedad de Alzheimer.

Alois Alzheimer expuso el 3 de noviembre de 1906, en el XXXVII encuentro de psiquiatras en Tubinga, Alemania, el caso clínico y neuropatológico de una mujer de 55 años de edad, conocida como Auguste D., que fue observada alrededor de 4 años hasta su muerte, la cual presentaba un tipo de demencia senil, actualmente nombrada enfermedad de Alzheimer (Giordanod, 2007; Lacor, 2007). Más de un siglo después del caso de Auguste D., la enfermedad de Alzheimer es la demencia más común en el mundo (~70%), su incidencia incrementa con la edad y su prevalencia aumenta exponencialmente con el aumento en la esperanza de vida de la población (de la Monte, 2009; Blennow, 2006). Según la OMS en México hay más de 500 mil casos de enfermedad de Alzheimer y en el mundo cerca de 20 millones, cantidad que se estima se triplicará para el 2050. La mayoría de los casos (>95%) son de manifestación tardía o casos esporádicos, enfermedad de Alzheimer esporádica, mientras que el resto de los casos tienen un origen hereditario, enfermedad de Alzheimer familiar. Esta última es una enfermedad autosómica dominante que se puede manifestar antes de los 65 años y es debida a mutaciones en los genes de la proteína precursora del péptido  $\beta$ -amiloide (localizado en el cromosoma 21) o en los genes homólogos de las presenilina1 y 2 (Blennow, 2006; Farfara *et al*, 2008; Hoyer, 2004).

El costo económico de la enfermedad de Alzheimer también es un factor ha considerar ya que los familiares absorben el 70% de los gastos cuidando a los enfermos en casa. Sin embargo el costo incrementaría considerando la baja productividad en el trabajo de pacientes en etapas iniciales y las enfermedades asociadas al estrés impuesto sobre los

especialistas en enfermería que los cuidan (Instituto nacional para el envejecimiento, de los institutos nacionales de salud de los E.E.U.U., 2010).

La mayoría de los pacientes con posible enfermedad de Alzheimer presentan pérdida de la memoria muy marcada, anomia, apraxia constructiva, agnosia y varios grados de cambios de personalidad en los cuales los pacientes pueden ser poco confiables, agresivos, y abiertamente delirantes. Para diagnosticar a un paciente con posible enfermedad de Alzheimer se requiere de una exploración clínica, neurológica y psiquiátrica. Incluso en casos muy tempranos, de la enfermedad de Alzheimer, las pruebas neuropsicológicas pueden ayudar a obtener datos objetivos de alteraciones de la memoria, aunado a pruebas de laboratorio que descarten otras causas de demencia en las personas con edad avanzada (Caselli *et al*, 2006; Blennow, 2006). Existen criterios comunes para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer descritos por el Instituto Nacional de desórdenes comunicativos y neurológicos e infarto de los E.E.U.U., y la asociación de la enfermedad de Alzheimer y desórdenes asociados (NINCDS-ADRDA, por sus siglas en inglés) desde 1984; así mismo, están los criterios del manual de estadística y diagnóstico de desórdenes mentales, cuarta edición (DSM-IV-TR, por sus siglas en inglés) (Caselli *et al*, 2006; Blennow, 2006). En la actualidad se estudian algunos bio-marcadores de la enfermedad de Alzheimer en plasma y líquido cefalorraquídeo y hay grandes avances en el diagnóstico por imágenes de resonancia magnética y tomografía por emisión de positrones, los cuales han demostrado ser muy valiosos para el diagnóstico y predicción del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (Ray *et al*, 2007; Instituto nacional para el envejecimiento, de los institutos nacionales de salud de los E.E.U.U., 2010).

En la enfermedad de Alzheimer hay una etapa clínica inicial en donde el deterioro cognitivo es apenas perceptible, el cual se ha denominado daño cognitivo sutil y se aplica frecuentemente a síndromes con presunta etiología degenerativa. Es importante notar que al momento de la autopsia ~80% de los pacientes diagnosticados con daño cognitivo sutil en un inicio llegan a presentar enfermedad de Alzheimer (Morris *et al*, 2001).

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad degenerativa que produce un deterioro de regiones del cerebro como el cerebro anterior basal colinérgico y las estructuras del lóbulo temporal medial, incluyendo al hipocampo, la amígdala y la corteza entorrinal, por lo que la pérdida de memoria es uno de los primeros correlatos clínicos de la EA. La enfermedad de Alzheimer se disemina al pasar los años siguiendo una secuencia característica, que involucra el cíngulo posterior, las regiones temporal, parietal, e isocortical. En base a esta distribución de cambios patológicos los rasgos clínicos corticales característicos de afasia, apraxia, y agnosia emergen junto con la consecuente amnesia y los cambios de personalidad. El término daño cognitivo sutil se usa operacionalmente para definir un estado de pre-demencia, dependiendo de la tasa de conversión de daño cognitivo sutil a demencia, que suele ser de entre 10% a 15% por año, y particularmente enfermedad de Alzheimer (Caselli *et al*, 2006). Lo anterior significa que en el inicio del curso de la EA, puede ser que los pacientes no estén dañados funcionalmente pero que presenten signos del inicio de un deterioro cognitivo. Así, se ha sugerido que el inicio de la enfermedad de Alzheimer puede ser 10 o 20 años antes de la manifestación de la enfermedad, y que en estas etapas iniciales algunos signos de alteraciones cognitivas sutiles (principalmente de memoria) se encuentren presentes, llevando a pensar que el daño inicial sea intermitente y a nivel sináptico o de la función metabólica neuronal (Selkoe, 2002; Hoyer, 2004).

#### 4.1. Neuropatología en la enfermedad de Alzheimer.

A nivel histológico, los cerebros con enfermedad de Alzheimer se caracterizan por la presencia de placas neuríticas en el parénquima cerebral, compuestas por depósitos del péptido  $\beta$ -amiloide que forman a su vez placas de amiloide y en las cuales se encuentran presentes otras proteínas, restos celulares y células gliales activadas. Otra característica importante son las marañas neurofibrilares, que son agregados de proteína tau (de unión a microtúbulos) y se encuentran dentro del cuerpo neuronal (Lee *et al*, 2009; Selkoe, 2002). Tanto las placas neuríticas, como las marañas neurofibrilares son los requisitos anatomo-patológicos durante el análisis *post-mortem* para establecer el diagnóstico de enfermedad de Alzheimer (Lacor, 2007). Sin embargo, aunque la presencia de ambos es necesaria para diagnosticar la EA, su presencia no es suficiente en todos los casos para desarrollar los síntomas clínicos (Ávila, 2006).

Aunado a estos daños del tejido neuronal, se encuentra también muerte de neuronas y una importante pérdida sináptica. Especialmente, en la enfermedad de Alzheimer hay pérdida de espinas dendríticas y sinapsis, tanto en autopsias como en biopsias de pacientes con posible EA. La pérdida de espinas dendríticas se ha calculado en más de un 50% en la corteza y el hipocampo, y la disminución de las sinapsis se observa aún en las neuronas sobrevivientes (Davies *et al*, 1987; Ferrer y Gullotta, 1990). Además, se ha observado que los niveles de sinaptofisina (marcador pre-sináptico), en la corteza frontal y el hipocampo, correlacionan directamente con la puntuación obtenida en las pruebas cognitivas de los pacientes con enfermedad de Alzheimer, lo que apoya que la pérdida sináptica pueda ser la causa inicial del deterioro cognitivo (Terry *et al*, 1991). De manera similar, el ratón transgénico 3XTg-AD (que contiene transgenes para la mutación sueca de la proteína



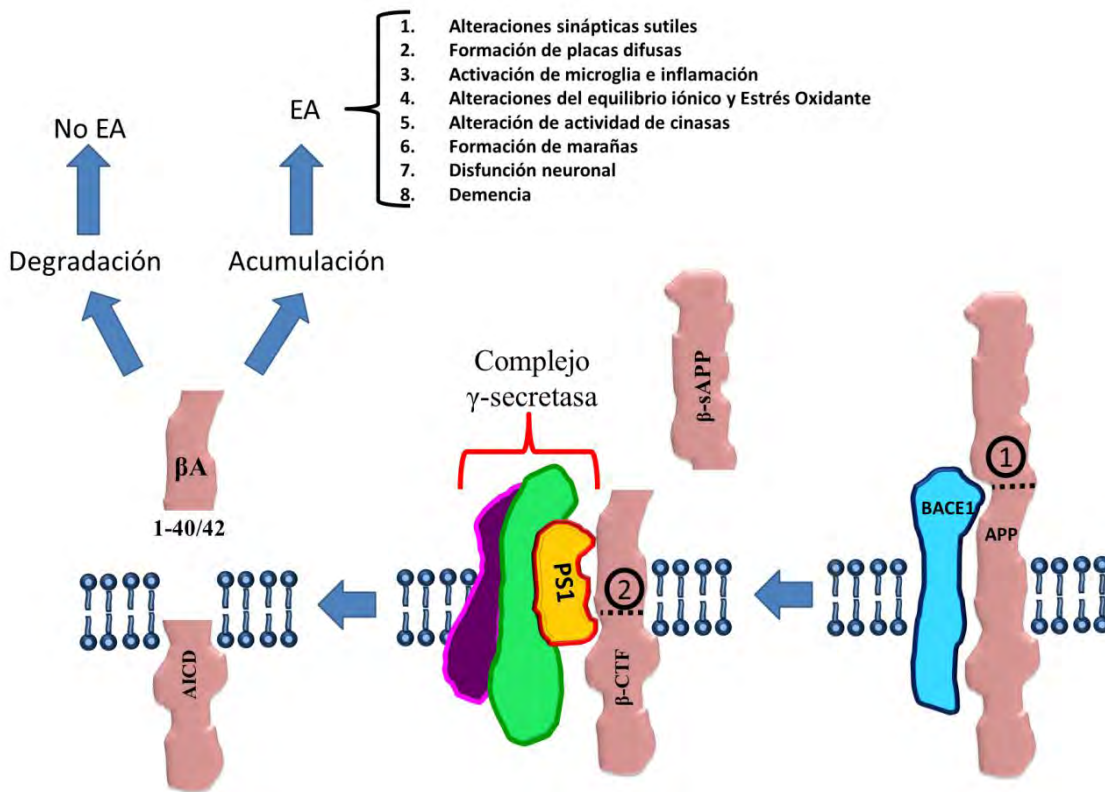
precursora del péptido  $\beta$ -amiloide humana, la proteína tau humana con mutación de prolina por leucina en el residuo 301, y la presenilina 1 con un cambio de metionina por valina en el residuo 146) presenta características histopatológicas similares a las ocurridas en la enfermedad de Alzheimer, con pérdida de espinas dendríticas y daño de la plasticidad sináptica, específicamente la potenciación a largo plazo (correlato electrofisiológico de memoria). Lo anterior relacionado con la presencia del péptido  $\beta$ -amiloide intracelular, antes de la formación de placas de péptido  $\beta$ -amiloide y marañas neurofibrilares, reiterando que las alteraciones sinápticas son eventos iniciales en la enfermedad de Alzheimer (Oddo *et al*, 2003; Bittner *et al*, 2010). Además, se sabe que la pérdida sináptica se presenta después del daño cognitivo, sugiriendo que primero hay un falla en la función sináptica y después viene la muerte sináptica y la pérdida neuronal (Selkoe, 2002; Coleman y Yao, 2003; Small, 2004).

Además de las alteraciones sinápticas mencionadas anteriormente, se observan cambios en proteínas sinápticas, como la debrina, en las espinas dendríticas postsinápticas excitatorias, aumentando o disminuyendo dependiendo del área del cerebro afectada y de la etapa de la enfermedad. Lo anterior ha llevado a postular que en la enfermedad de Alzheimer la patología sináptica empieza con una pérdida sutil de sinapsis, especialmente colinérgicas y glutamatérgicas, acompañada por una disminución de las espinas dendríticas. La pérdida de contactos sinápticos se compensa en un inicio por el agrandamiento de las sinapsis restantes y la generación de nuevos contactos sinápticos con las terminales aferentes. Sin embargo, con el progreso de la enfermedad, éste mecanismo se sobrepasa, dejando un número reducido neto de contactos sinápticos, interrumpiendo los circuitos neuronales funcionales y produciendo las deficiencias cognitivas (Scheff y Price, 2003).

## 4.2. Participación del péptido $\beta$ -amiloide en la disfunción sináptica.

El péptido  $\beta$ -amiloide, el principal componente de las placas neuríticas, es el producto del corte proteolítico de la proteína precursora del péptido  $\beta$ -amiloide, la cual se encuentra abundantemente en la superficie celular neuronal, y se produce de manera constitutiva en el metabolismo celular normal (Haass *et al*, 1992). La proteína precursora del péptido  $\beta$ -amiloide es producto del corte y empalme alternativo de su gen en el cromosoma 21, siendo la isoforma predominante en tejido neuronal la proteína precursora del péptido  $\beta$ -amiloide de 695 aminoácidos. La proteína precursora del péptido  $\beta$ -amiloide puede procesarse por dos vías diferentes, la vía amiloidogénica y la no amiloidogénica, siendo la vía amiloidogénica la que lleva a la producción de péptido  $\beta$ -amiloide (Ling *et al*, 2003) (Esquema. 1). En la vía amiloidogénica el primer corte proteolítico es llevado a cabo por una proteasa de grupos aspartilo transmembranal, la enzima de corte de la proteína precursora del péptido  $\beta$ -amiloide del sitio  $\beta$ -1 (BACE1), principalmente (Vassar *et al*, 1999). El segundo corte proteolítico es llevado a cabo por un complejo de proteasas intramembranales que se compone de cuatro enzimas: la presenilina (1 o 2), la nicastrina, la proteína potenciadora de la presenilina (PEN-2), y la proteína defectuosa de la faringe anterior 1 (APH-1); siendo la presenilina 1 (PSN 1) la proteína con actividad proteolítica (Gandy, 2005) (Esquema. 1). La proteína precursora del péptido  $\beta$ -amiloide madura en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi. Posteriormente se corta la proteína precursora del péptido  $\beta$ -amiloide en el sitio  $\beta$ , en endosomas tempranos, y luego se da el corte de la  $\gamma$ -secretasa, probablemente también en endosomas tempranos, posteriormente el péptido  $\beta$ -amiloide generado puede ser secretado al medio extracelular en su forma soluble y en menor grado en exosomas (Caporaso *et al*, 1992; Kaether *et al*, 2006; Rajendran *et al*,

2006). El péptido  $\beta$ -amiloide es degradado principalmente por 2 enzimas, la neprilisina y la IDE (enzima degradadora de la insulina) (Carson y Turner, 2002). El péptido  $\beta$ -amiloide también es llevado fuera del cerebro por proteínas relacionadas al receptor de lipoproteínas de baja densidad, mientras que, por otro lado, puede entrar a través del receptor para productos finales de glicación avanzada a través de la barrera hemato encefálica (Tanzi *et al*, 2004). De manera muy interesante se ha encontrado que la presencia de oligómeros del péptido  $\beta$ -amiloide solubles correlaciona con la pérdida sináptica y el deterioro cognitivo, así como con decrementos en la expresión de proteínas como la proteína de a densidad postsináptica de 95 kDa (PSD-95), sinaptofisina, inhibición de la potenciación a largo plazo y déficits cognoscitivos, tanto en modelos transgénicos de enfermedad de Alzheimer como en cerebros postmortem y de autopsias de pacientes con enfermedad de Alzheimer (Ávila, 2006; Lazarov *et al*, 2002; Gylys *et al*, 2004; Rowan *et al*, 2005; Bayer *et al*, 2001; Lue *et al*, 1999; Oddo *et al*, 2003; Mucke *et al* 2000). Además de manera indirecta, varios estudios han demostrado que los anticuerpos generados contra especies oligoméricas solubles del péptido  $\beta$ -amiloide se observan rodeando el cuerpo neuronal, interpretado esto como la posibilidad de que las especies oligoméricas solubles del péptido  $\beta$ -amiloide oligoméricas se encuentren rodeando el árbol dendrítico (Lacor *et al*, 2004). Por lo tanto, el entender si el péptido  $\beta$ -amiloide juega un papel en las modificaciones tempranas, observadas en la función sináptica, (Selkoe, 2002), es muy importante para tratar de conocer la secuencia de eventos fisiopatológicos que ocurren en la enfermedad de Alzheimer (Walsh y Selkoe, 2004).



Esquema 1. Cascada de generación del péptido  $\beta$ -Amiloide ( $\beta$ A). La proteína precursora del péptido  $\beta$ -Amiloide es cortada por la proteína BACE1 en el sitio de corte del péptido  $\beta$ A (1). Posteriormente se produce el corte por la  $\gamma$  secretasa intramembranal (2), liberando el fragmento del péptido  $\beta$ -Amiloide de 40- 42 aminoácidos de largo. En condiciones normales el péptido  $\beta$ -Amiloide es degradado por varias enzimas (ver texto). La acumulación de péptido  $\beta$ -Amiloide por falta de degradación (Enfermedad de Alzheimer esporádica) o por sobreproducción (Enfermedad de Alzheimer hereditaria), supone la serie de eventos que, finalmente producen la demencia en la EA, iniciando por las alteraciones sinápticas.

### 4.3. Principales factores de riesgo para desarrollar enfermedad de Alzheimer.

La etiología de la enfermedad de Alzheimer es desconocida aún, siendo los principales factores de riesgo para su manifestación el envejecimiento y el padecimiento de enfermedades crónico degenerativas, como enfermedad coronaria, obesidad y diabetes (Blennow, 2006; Farfara *et al*, 2008; Hoyer, 2004). De manera interesante, hace más de dos

décadas, se han observado alteraciones metabólicas en la enfermedad de Alzheimer como reducción de la utilización de glucosa (entre 45% y 18%), reducción del flujo sanguíneo cerebral, en etapas tempranas, y alteraciones en los niveles de insulina; sugerentes de que la vía de señalización de insulina en la enfermedad de Alzheimer se encuentra alterada (Frölich *et al*, 1998; de la Monte, 2009).

Aunado a lo anterior los datos epidemiológicos han señalado a la diabetes mellitus tipo 2 como un factor de riesgo para la enfermedad de Alzheimer (Umegaki, 2010; Schrijvers *et al*, 2010; Sima, 2010; Matsuzaki *et al*, 2010; Li y Hölscher, 2007), incrementando casi al doble el riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer, y que este riesgo incrementa aún más cuando se asocia con enfermedades cardiovasculares o dislipidemias (Li y Hölscher, 2007). Es interesante notar que la resistencia a la insulina, que se asocia con la diabetes mellitus tipo 2, también incrementa con la edad y también representa un riesgo para desarrollar deficiencias cognitivas, como baja velocidad perceptual y en algunos casos demencia de tipo enfermedad de Alzheimer (Umegaki, 2010; Schrijvers *et al*, 2010; Sima, 2010; Matsuzaki *et al*, 2010). En el estudio Hisayama, Matsuzaki y colaboradores, demostraron que los niveles altos de insulina y/o glucosa en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 acelera la carga amiloidea y la formación de placas neuríticas en individuos que poseen el alelo épsilon 4 de la apolipoproteína E (Matsuzaki *et al*, 2010; Li y Hölscher, 2007; Costantini *et al*, 2006). Por otro lado, la resistencia a insulina es una condición patológica que frecuentemente se presenta en conjunto con presión sanguínea elevada, enfermedad cardiovascular, dislipidemia y niveles elevados de colesterol (Li y Hölscher, 2007), que han sido señalados como factores de riesgo para desarrollar EA, por

lo que conocer la relación que puedan tener las alteraciones en la vía de señalización de la insulina cerebral con la enfermedad de Alzheimer resulta por demás interesante.

## **5. Cascada de señalización Insulina/PI3K.**

La insulina es una hormona peptídica, producida por las células  $\beta$  en los islotes de Langerhans del páncreas, en respuesta al aumento de la glucosa sanguínea ( $\geq 6$  mM) que ocurre durante el consumo de carbohidratos. La secreción de insulina estimula la captura de glucosa de la sangre en tejidos sensibles a la insulina como el hepático, adiposo, y muscular. Ahí la glucosa es ocupada para la generación de moléculas de Adenosina Trifosfato (ATP), o convertida en macromoléculas como glucagón o triglicéridos (Adipocitos). Adicionalmente la insulina actúa como hormona de crecimiento y promueve en el cerebro la señal de saciedad, indicando la cantidad de glucosa disponible (Nussey y Whitehead, 2001; Stützer *et al*, 2012).

La insulina se une a su receptor, una proteína transmembranal tetramérica, la cual se compone de dos subunidades extracelulares  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$  transmembranales con actividad de tirosina cinasa (Esquema 2). La subunidad  $\beta$  tiene tres regiones con sitios de autofosforilación: un sitio cerca de la membrana, otro dentro del asa de regulación, y el tercero en el extremo carboxilo terminal, las cuales tienen diferentes funciones en la propagación de la señalización. La unión de la insulina induce la fosforilación en residuos de tirosina en las subunidades  $\beta$  del receptor de insulina. Una vez fosforilado el receptor de insulina atrae proteínas adaptadoras que contienen dominios de unión a fosfo-tirosinas (PTB, siglas en inglés) como el sustrato del receptor de insulina (SRI) y la proteína homóloga del colágeno Src (Shc, siglas en inglés), y proteínas con dominio homólogo a Src

(SH2), incluida PI3Kp85, Akt y la cinasa de la sintetasa de glucógeno 3 (GSK3) (Esquema 2). Proteínas como el sustrato del receptor de insulina 1 y 2 (SRI-1 y SRI-2), se unen a las tirosinas fosforiladas del receptor de insulina y son activadas de manera que pueden promover la unión del dominio SH2 de la cinasa PI3K de clase IA, el cual se une a residuos de fosfo-tirosina en los receptores activados y proteínas adaptadoras (Esquema 2). Tanto el SRI-1 como el SRI-2 pueden estimular la fosforilación del RI, dependiendo de la afinidad de las proteínas sustrato para el RI, la concentración de la proteína sustrato, la compartimentalización celular del RI, y el contexto celular, de manera que la actividad de cinasa del receptor de insulina se incrementa activando componentes río abajo (Niessen *et al.*, 2007).

La unión de PI3K, a fosfo-tirosinas en las proteínas sustrato del receptor de insulina, permite la liberación de la subunidad p85 de PI3K que inhibe a la subunidad p110 de la misma PI3K. Así el heterodímero p85-p110 se puede unir a su sustrato fosfatidil inositol -4, 5- bifosfato (PIP<sub>2</sub>) en la membrana plasmática y producir fosfatidil inositol -3, 4, 5- trifosfato (PIP<sub>3</sub>). La actividad de PI3K es contrarrestada por la proteína fosfatasa y homóloga de tensina (PTEN) la cual hidroliza PIP<sub>3</sub> a PIP<sub>2</sub> actuando como un antagonista catalítico de PI3K (Zhao y Vogt, 2008) (Esquema 2).

La síntesis de PIP<sub>3</sub> lleva al reclutamiento de cinasas de serina/treonina, como Akt, que tiene un dominio homólogo de pleckstrina (PHD, siglas en inglés) el cual se puede unir a lípidos de fosfatidil inositol en las membranas celulares. En la membrana celular Akt es fosforilada por la proteína cinasa dependiente de 3-fosfoinositidos PDK1, en el residuo de treonina 308 y serina 473, activándose completamente (Esquema 2).

### **5.1. Efectos derivados de la activación de Akt en la vía Insulina /PI3K.**

La cinasa Akt actúa sobre varias proteínas jugando un papel muy importante en procesos como la síntesis proteica, crecimiento y metabolismo celular, apoptosis y plasticidad neuronal. Por ejemplo, Akt fosforila factores de transcripción miembros de la familia “Forkhead” (FOXO), los cuales se unen a DNA, y promueven la transcripción de genes que regulan el metabolismo y la plasticidad neuronal (Accili y Arden, 2004; Burgering y Kops, 2002; Greer y Brunet, 2005; Kenyon, 2005) (Esquema 2).

Akt también actúa sobre el complejo de las proteínas de esclerosis tuberal 1 y 2 (TSC1-TSC2) activándolo. El complejo TSC1-TSC2 activado inhibe la actividad de GTPasa de Rheb, el cual se acumula y activa al complejo de la cinasa de mamífero blanco de rapamicina (mTOR)-RAPTOR, fosforilando y activando a la proteína 1 de unión al factor eucarionte de inicio de la traducción 4E (4E-BP1) y a la cinasa p70S6 (p70S6K), regulando negativamente la familia de factores de la transcripción FOXO (Esquema 2), al promover su translocación del núcleo al citoplasma donde es inactivado por proteínas 14-3-3 (Zhao y Vogt, 2008; Plum *et al*, 2006; Engelman *et al*, 2006).

Los factores de transcripción FOXO a su vez, median la transcripción de varias proteínas pro-apoptóticas como el ligando de Fas (Fas-L) y la proteína pro-apoptótica Bim. El bloqueo de la transcripción de FOXO produce a su vez efectos anti-apoptóticos. Más aun, Akt puede fosforilar directamente, a la proteína inhibidora de cinasas, p27Kip1 y el antagonista de BCL2 de muerte celular (BAD) (Esquema 2), lo que lleva a su inactivación al unirse con proteínas 14-3-3 (Engelman *et al*, 2006; Collado *et al*, 2000; Linseman *et al*, 2002).



Otros efectos asociados a la actividad de PI3K a través de Akt, son el transporte de glucosa, la inhibición de la apoptosis y el mantenimiento de la integridad de la membrana mitocondrial. Al mismo tiempo su actividad se ha asociada a la protección contra la producción de radicales libres. (De la monte, 2009; Zhao y Vogt, 2008).

## **5.2. Modulación de la vía Insulina/PI3K.**

La vía de señalización de insulina puede ser modulada por la acción de cinasas activadas por hormonas, factores de crecimiento, factores nutricionales, o por mutaciones en genes de las proteínas involucradas en la vía de señalización de la insulina.

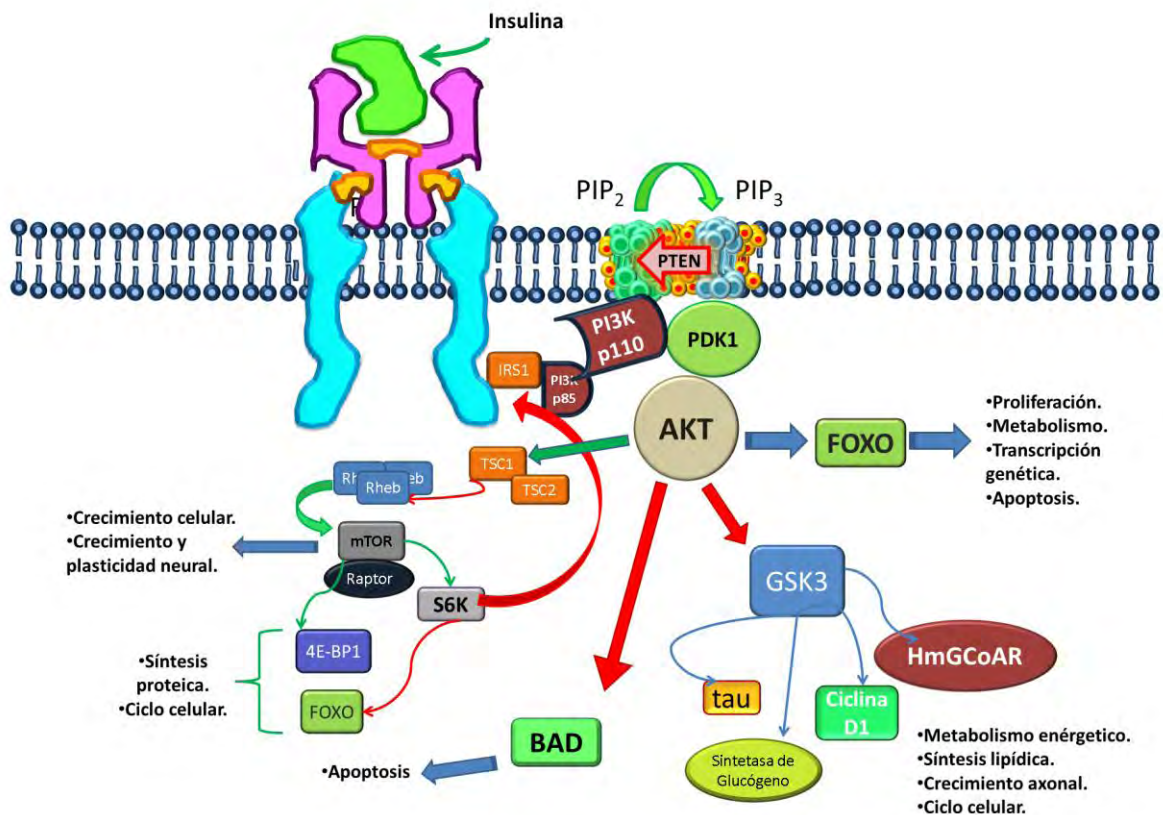
Cinasas como mTOR, JNK, p70S6K, y PKC $\theta$  pueden regular la fosforilación del sustrato de receptor de insulina 1 (SRI-1) y promover su degradación por el proteasoma (Esquema 2). Además mTOR puede regular la actividad de la fosfatasa de proteínas 2A (PP2A, siglas en inglés), y de esa manera regular los estados de fosforilación y de desfosforilación de la cinasa de la sintetasa de glucógeno 3 (GSK3) en la serina 9. De igual manera, la activación prolongada de Akt y su fosforilación en la serina 473, se ha relacionado con inhibición de la señalización de insulina. Así mismo PTEN puede actuar sobre PIP $_3$  y de esa manera contrarrestar la acción de PI3K y la transducción de la señal (Zhao y Vogt, 2008; Zhao *et al*, 2008; Meske *et al*, 2008) (Esquema 2).

Las dietas altas en grasas producen resistencia a insulina al alterar la capacidad de la insulina para activar la vía SRI/PI3K (Gerozissis, 2008). Así mismo, en el tejido de ratas obesas, las cinasas mTOR y p70S6K son sobre-activadas por la insulina, incrementando la fosforilación del SRI-1 en residuos serina 636 y serina 639, y alterando la activación de Akt

(Khamzina *et al*, 2005). La pérdida de la regulación de la señalización de insulina mediada por mTOR puede generar también resistencia a insulina y pérdida de su señalización, como muestran los pacientes tratados con rapamicina, un inhibidor de mTOR (Di Paolo *et al*, 2006).

Por otro lado, la obesidad se asocia con estrés oxidante, y este a su vez con la fosforilación del residuo de serina 307 y serina 632 del SRI-1, y con la activación de la cinasa  $\beta$  del inhibidor  $\kappa$  (IKK $\beta$ ) y la cinasa c-Jun (JNK), aunque se ha demostrado que la sola fosforilación de SRI-1 en la serina 307 afecta la señalización de insulina previniendo la activación de PI3K (Bloch-Damti *et al*, 2006).

Aunado a la obesidad y el estrés oxidante, existen estados hereditarios de resistencia a insulina, en los que se sobre-expresa la subunidad p85 de PI3K, o en las que hay mutaciones puntuales en el gen Akt2, lo cual sugiere la inhibición de la señal río abajo de las dos cinasas (Engelman *et al*, 2006).



Esquema 2. Insulina y su efecto en células no neuronales y neuronales. La insulina se une a su receptor promoviendo la autofosforilación de éste y la unión de proteínas adaptadoras como SRI1. La activación de estas proteínas promueve la unión de proteínas cinasas que transducen la señal río abajo a sus proteínas blanco, promoviendo los efectos relacionados a la insulina. Flechas verdes (activación), Flechas rojas (inactivación), flechas azules (regulación).

## 6. Vía de la Insulina/PI3K en el cerebro.

En años recientes los efectos de la insulina en el cerebro han llamado la atención por su participación en procesos mentales como la memoria, aprendizaje y, en especial, ha surgido interés sobre el papel de la insulina en desordenes mentales, como la enfermedad de Alzheimer, cuyo participación parece ser cada vez más documentada (Watson y Craft, 2004; Zhao *et al*, 2008).

La insulina que se produce en las células  $\beta$  del páncreas puede llegar al cerebro a través de la barrera hemato-encefálica por transporte mediado por receptores o pasar a través de los órganos circunventriculares (Zhao *et al*, 2008; Plum *et al*, 2006). También se ha demostrado la presencia de RNA mensajero en neuronas del cerebro mamífero, lo que sugiere que la insulina puede ser producida localmente (Gerozissis, 2003). Así mismo, se ha observado una estricta regulación de los niveles de insulina y de su receptor en el cerebro, lo cual puede sugerir que los niveles de insulina en el cerebro no dependen exclusivamente de los de la periferia. Sin embargo el origen de la insulina cerebral (local, periférico o compartido) aún no se ha esclarecido (Havrankova *et al*, 1979; Zhao *et al*, 2008; Gerozissis, 2008).

El receptor de insulina se encuentra ampliamente distribuido en el cerebro de mamíferos. En roedores y humanos, el receptor de insulina muestra mayor concentración en el bulbo olfatorio, el hipotálamo, la glándula pituitaria, el hipocampo, la corteza cerebral, el cerebelo, y particularmente se encuentra con mayor concentración en las terminales sinápticas. De igual manera, varios de los componentes de la vía de señalización de la insulina presentan patrones de expresión que se superponen con la expresión del receptor de insulina en el cerebro, lo que supone la presencia de la vía Insulina/PI3K en el cerebro mamífero (Abbott *et al*, 1999; Gasparini *et al*, 2002; Plum *et al*, 2006; Zhao *et al*, 2008; Gerozissis, 2008;).

La mayoría de la neuronas expresan todas las isoformas de la subunidad reguladora p85 de la cinasa de fosfoinositidos (PI3K), aunque en hipocampo, bulbo olfatorio y cerebelo, se presentan niveles relativamente altos de su subunidad catalítica p110 (Shin *et al*, 1998; Trejo y Pons, 2001), lo que puede dar como resultado diferentes papeles de PI3K en la

fisiología celular, dependiendo de su localización subcelular y el contexto metabólico celular (Rodgers y Theibert, 2002).

La cinasa PI3K, promueve la actividad de la cinasa Akt, y a su vez la activación del factor de transcripción del elemento de unión de respuesta a AMP cíclico (CREB), modula la actividad de la cinasa de la sintetasa de glucógeno 3 (GSK-3), y promueve la fosforilación de proteínas como la ciclina D1 y la actividad del factor  $\alpha$  de iniciación de la traducción eucarionte 2 eIF2- $\alpha$  (Je *et al*, 2009; Je *et al*, 2011). Lo anterior se traduce en la proliferación de células neuronales, especialmente en el hipocampo (Peltier *et al*, 2007), la regulación de la progresión del ciclo celular neuronal y el crecimiento de astrocitos (Jope y Johnson, 2004) (Esq. 2). La cinasa GSK-3 modula la fosforilación de la proteína de unión a microtúbulos *tau*. Cuando la regulación de GSK-3 se pierde, *tau* es hiperfosforilada y forma agregados fibrilares, resistente a proteólisis, que tienden a acumularse dentro de las neuronas, formando pequeños oligómeros tóxicos para la neurona, presentes en la enfermedad de Alzheimer (Ho *et al*, 2004; Ávila, 2006).

Así, la vía de señalización de la insulina en el cerebro puede activar proteínas involucradas en la regulación de la transcripción, la supervivencia celular, el metabolismo energético, el crecimiento neuronal, y la plasticidad sináptica (Zhao y Vogt, 2008).

## 6.1. La vía de señalización Insulina/PI3K en la función sináptica.

Los receptores de insulina que se encuentran en las sinapsis tienen un papel importante en la regulación de la función sináptica, al activar la vía de la cinasa de fosfoinositidos (PI3K) (Man *et al*, 2003; Zhao *et al*, 2008).

En el desarrollo cerebral, y en el cerebro adulto, la activación de PI3K por factores neurotróficos, como la neurotrofina 3 (NT-3) o el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, siglas en inglés), está involucrada en el desarrollo axonal, la formación sináptica, la maduración de las sinapsis, así como la arborización dendrítica en neuronas de hipocampo y cambios duraderos en la fuerza sináptica, dependientes de la síntesis de proteínas tanto en presinapsis y postsinapsis, modulando la formación del cono de crecimiento axonal, la dirección axonal, y el establecimiento de la polaridad neuronal (Sui *et al*, 2008; Je *et al*, 2009; Akiyama y Kamiguchi, 2010; Je *et al*, 2011).

La cinasa PI3K activa a la cinasa Akt, modulando la función de la cinasa de la sintetasa de glucógeno 3 (GSK-3), regulando a su vez el crecimiento axonal, y el transporte axonal, al fosforilar proteínas de unión a microtúbulos como MAP1B y *tau* (Jope y Johnson, 2004) (Esq. 2).

La vía Insulina/PI3K modula la transmisión y plasticidad sináptica, activando a las cinasas Akt y la cinasa de mamífero blanco de la rapamicina (mTOR). La cinasa mTOR puede promover la traducción de nuevas proteínas en las presinapsis y postsinapsis, a través de la actividad del factor de iniciación de la traducción eucarionte 2 (eIF2- $\alpha$ ) produciendo los cambios duraderos en la fuerza sináptica (la fuerza sináptica entendida como cambios, transitorios o duraderos, en el potencial de membrana al activarse los receptores de neurotransmisores en la postsinapsis, y se asocian a mecanismos de plasticidad sináptica

que pueden ser el sustrato del aprendizaje y la memoria) (Tang *et al*, 2002; Je *et al*, 2009; Je *et al*, 2011). La activación de la vía Insulina/PI3K, regula los niveles de la proteína de la densidad post sináptica PSD-95, la cual se une con los receptores para N-metil D-aspartato (NMDA) en la membrana sináptica, y se relaciona con el incremento de la respuesta sináptica a través de estos receptores en sinapsis de la región CA1 del hipocampo, así como la expresión de receptores para NMDA en presencia de insulina en oocitos de *Xenopus laevis* (Lee *et al*, 2005). La activación de la cinasa PI3K también regula los procesos de la potenciación a largo plazo (LTP) y de depresión a alargo plazo (LTD), que se asocian con los eventos moleculares que subyacen al establecimiento de la memoria y el aprendizaje, a través de la formación de complejos con receptores NMDA y su translocación a la membrana (Man *et al*, 2003; Zhao *et al*, 2008; Gasparini *et al*, 2002; Nelson y Alkon, 2005). Además la inhibición de PI3K, usando su inhibidor LY294002, bloquea el mantenimientos de la LTP en el hipocampo *in vivo*, asociado con una fosforilación transitoria de la cinasa Akt en la serina 473 (Horwood *et al*, 2006). En este sentido, la cinasa Akt puede mantener la fuerza sináptica a través de la fosforilación de los receptores del ácido gamma amino butírico (GABA) en dendritas (Wang *et al*, 2003). Sin embargo la vía insulina también puede ser modificada por la actividad sináptica, en neuronas estimuladas con glutamato, (activando receptores para NMDA) y cloruro de potasio, y probablemente involucra entrada de  $Ca^{2+}$  y activación de cinasas dependientes de  $Ca^{2+}$  (Zhao *et al*, 2008; Nelson y Alkon, 2005).

La actividad de la vía Insulina/PI3K se relaciona con los procesos de memoria y aprendizaje, por ejemplo, se ha visto que durante la adquisición de memoria se modifica la vía Insulina/PI3K (Zhao *et al*, 2004). La expresión del receptor de insulina se incrementa

después de tareas de aprendizaje espacial, en hipocampo de roedores (Zhao *et al*, 2008), regulándose la liberación de neurotransmisores, así como el reclutamiento de receptores en las sinapsis de los árboles dendríticos neuronales (Wei *et al*, 2007). Adicionalmente, la infusión *in vivo* del inhibidor específico de PI3K, wortmanina, junto con LY294002 y el inhibidor de la cinasa mTOR, rapamicina, dentro de la corteza prefrontal, también inhibe la retención a largo plazo de la traza de memoria de miedo (Sui *et al*, 2008), sugiriendo que la activación de la vía PI3K es necesaria en la adquisición de memoria.

## **6.2. Algunos factores que modulan la función de la vía Insulina/PI3K en el cerebro.**

Diversos factores, relacionados al estilo de vida y la alimentación se han visto involucrados en la modulación de la vía Insulina/PI3K. Por ejemplo, durante el ejercicio se promueve la activación de PI3K en el cerebro adulto, la supervivencia de células granulares del giro dentado, formadas *de novo*, y un incremento en la plasticidad sináptica (Bruehl-Jungerman *et al*, 2009). Por otro lado, el balance en la ingesta de ácidos grasos del tipo  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 modula la actividad de la vía PI3K y la supervivencia celular. Se ha demostrado que los niveles bajos de ácido docosahexaenóico (DHA), un ácido graso  $\omega$ -3 producen un decremento en la señalización a través de PI3K, en neuronas de ratones. Los niveles de DHA modifican los niveles de fosfatidil-serina en las membranas celulares, facilitando la translocación y activación de Akt, previniendo la apoptosis. Además los bajos niveles de DHA producen estrés oxidante e inflamación, potenciando además la producción de péptido  $\beta$ -amiloide (Lim *et al*, 2005; Akbar *et al*, 2005).



## 7. Relación entre la vía Insulina/PI3K y el péptido $\beta$ -amiloide.

Se sabe que la proteína precursora del péptido  $\beta$ -amiloide y sus derivados están presentes en grandes cantidades y son transportados a las terminales sinápticas, y que los pequeños oligómeros de péptido  $\beta$ -amiloide son secretados en las terminales sinápticas, lo que puede dañar la función sináptica en el hipocampo y producir deficiencias en la memoria (Cheng *et al*, 2002; Lazarov *et al*, 2002). Por otro lado, el péptido  $\beta$ -amiloide compite con la insulina por el receptor de insulina (RI), pudiendo alterar su función y dañar la activación de la vía PI3K, la proteína cinasa dependiente de calcio-calmodulina (CaMK), y la cinasa Akt, inhibiendo el establecimiento de la potenciación a largo plazo (LTP), alterando además la plasticidad sináptica y la arquitectura de las espinas dendríticas (Townsend *et al*, 2007). Además, el péptido  $\beta$ -amiloide está involucrado en la remoción de receptores de ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) por endocitosis en las sinapsis (Hsieh *et al*, 2006; Snyder *et al*, 2005; Shankar *et al*, 2007; Zhao *et al*, 2009). También se ha demostrado que los ligandos difusibles derivados del péptido  $\beta$ -amiloide (ADDL, siglas en inglés) se pueden unir a neuronas corticales y a preparaciones de sinaptosomas corticales, lo que altera la homeostasis del calcio, y en neuronas, modifica la localización celular del RI, llevando en consecuencia a un estado semejante a la resistencia a insulina (Mungarro-Menchaca *et al*, 2002; Zhao *et al*, 2008). Además, se ha observado que el péptido  $\beta$ -amiloide compite con la insulina por la unión a la enzima degradadora de la insulina (IDE, siglas en inglés), de manera que altas concentraciones de insulina, en los casos de hiper-insulinemia, supondrían alteraciones en la eliminación del péptido  $\beta$ -amiloide, promoviendo la producción de placas amiloides y/o abundancia de especies oligoméricas de péptido  $\beta$ -amiloide tóxicas (Man *et al*, 2003). Por lo anterior, se ha

sugerido que la deficiencia en la señalización por insulina, producida por la inhibición del receptor de insulina por el péptido  $\beta$ -amiloide, promueve degeneración neuronal al producir una baja actividad de factores tróficos, déficits en el metabolismo energético y expresión génica mediada por la insulina, incluyendo los de la homeostasis de la acetilcolina, encontrada disminuida en la enfermedad de Alzheimer (De la Monte, 2009). La supresión de la actividad enzimática del receptor de insulina puede suceder de diferentes formas; Por ejemplo, la activación del ciclo de retroalimentación negativa de la vía de la insulina, se sabe que es causado por estrés oxidante y factores pro-inflamatorios, contribuyendo al desarrollo de la resistencia a insulina en tejidos periféricos (Zhao *et al*, 2008). En este sentido, se ha observado que la fosforilación del sustrato del receptor de insulina 1 (SRI-1) en residuos de serina 636/639 por mTOR afecta la señalización por insulina al dañar la activación de la cinasa PI3K, debido a la redistribución subcelular del complejo SRI-1/PI3K en el citoplasma (Tremblay *et al*, 2005). Por otro lado, la elevación en la actividad de fosfatasas de tirosinas, atenúa la actividad cinasa de tirosinas del receptor de insulina, mientras que la fosforilación de residuos de treonina y serina dentro del receptor de insulina inhibe, debido a cambios conformacionales, la capacidad de la fosforilación de residuos de tirosina (Zhao *et al*, 2008). Sin embargo, no se sabe de qué manera se une el péptido  $\beta$ -amiloide al receptor de insulina y la enzima degradadora de la insulina, así como la manera en que modula la vía de señalización Insulina/PI3K, que está involucrada en la función sináptica. Por lo que estudiar los efectos del péptido  $\beta$ -amiloide en la señalización a través de la vía Insulina/PI3K ayudaría a entender el papel que juega esta vía en la patología de la EA.

## **8. Planteamiento del Problema.**

A pesar de los recientes hallazgos sobre la vía de señalización de insulina en el sistema nervioso central, los efectos de la insulina, en conjunto con el péptido  $\beta$ -amiloide, no han sido estudiados completamente sobre la función pre-sináptica. Tampoco se ha aclarado aún si las alteraciones en la señalización por insulina, en las terminales pre-sinápticas, son un factor de riesgo o contribuyen a exacerbar algunas de las manifestaciones asociadas con la enfermedad de Alzheimer. De igual manera, no se han estudiado completamente los principales mecanismos moleculares que son alterados en la vía de señalización Insulina/PI3K en presencia del péptido  $\beta$ -amiloide, que intervienen en la función sináptica. Por lo anterior, el principal objetivo de este estudio fue analizar las interacciones que existen entre la activación del receptor de insulina en presencia de su ligando insulina y del péptido  $\beta$ -amiloide, así como su efecto en la actividad metabólica en dos regiones con diferente densidad de receptores a insulina, la corteza y el hipocampo de cerebro de rata.

## **9. Hipótesis.**

El péptido  $\beta$ -amiloide inhibe la activación de la vía Insulina/PI3K en terminales presinápticas a través de su interacción con el receptor de insulina.

## **10. Objetivo general.**

Estudiar los efectos de la insulina y el péptido  $\beta$ -amiloide sobre la activación de la vía Insulina/PI3K en sinaptosomas.

### **10.1. Objetivos particulares.**

1. Estudiar el efecto de la insulina sobre la función metabólica, medida como reducción de MTT, en sinaptosomas de hipocampo y corteza cerebral de rata.
2. Estudiar la activación del sustrato de receptor de insulina 1 y la cinasa Akt con diferentes concentraciones de insulina en sinaptosomas de hipocampo y corteza.
3. Estudiar el efecto del péptido  $\beta$ -amiloide sobre la función metabólica sináptica de hipocampo y corteza cerebral de ratas en ausencia y presencia de insulina
4. Analizar los efectos del péptido  $\beta$ -amiloide sobre la activación del sustrato de receptor de insulina 1 y la cinasa Akt en sinaptosomas de ratas.
5. Analizar si la insulina modula los efectos que el péptido  $\beta$ -amiloide produce en los sinaptosomas de ratas.

## 11. Métodos.

### 11.1. Obtención de sinaptosomas.

Se decapitaron ratas Wistar macho (220-250 g), se seccionó el cerebro y se obtuvo una fracción sinaptosomal por el método de Löscher et al. (Löscher *et al*, 1985), ligeramente modificado (Mungarro-Menchaca *et al*, 2002). En breve, se disecaron la corteza y el hipocampo en hielo, se homogenizaron en una solución conteniendo sacarosa 0.32 M y Hepes a pH 7.2 y posteriormente se centrifugaron a 1000 g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se depositó sobre 1 ml de una solución de sacarosa 1.2 M y centrifugado a 32,500 g y 4°C por 30 min. La interfase del gradiente se colectó cuidadosamente y diluyó en una solución de sacarosa 0.32M a un volumen final de 2 ml. La dilución se depositó sobre 1 ml de sacarosa 0.8 M y centrifugada por 30 min a 32,500 g. El botón sináptico obtenido se resuspendió en 2 ml de solución de Locke preparada con 154 NaCl, 5.6 KCl, 2.3 CaCl<sub>2</sub>, 1.0 MgCl<sub>2</sub>, 3.6 NaHCO<sub>3</sub>, 5.0 glucosa, y 5.0 Hepes (en mM), a pH 7.2. Posteriormente, se incubaron alícuotas de 200 µl con 50 µg de proteína sinaptosomal por 10, 15 o 60 min a 37°C con insulina 10, 100 o 1000 nM (Calbiochem) en presencia o ausencia de del fragmento 25–35 del péptido β-amiloide (25 µM; Sigma Chemicals). Un grupo adicional de alícuotas fue incubado con 25 µM del fragmento 25–35 del péptido β-amiloide por 10 minutos, antes de una incubación por 10 min con insulina, así mismo otro grupo se incubó con insulina 10 minutos antes del tratamiento con βA.

### **11.2. Evaluación de la función mitocondrial en sinaptosomas.**

Se examinó la actividad redox mitocondrial a través de la conversión de la sal de bromuro de 3-[4, 5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio (MTT) a cristales de formazán al ser reducidos por la cadena respiratoria mitocondrial, tal como se describió previamente (Mossman, 1983). El MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) se disolvió en PBS a una concentración de 5 mg/ml, se agregó a los sinaptosomas (concentración final de 0.5 mg/ml) y se dejó incubando por 15 minutos adicionales o 1 hora según fue apropiado.

Los sinaptosomas se centrifugaron a 1500 g por 5 min y el botón se solubilizó con 2-isopropanol ácido (0.5 ml). La absorbancia de cada muestra se cuantificó a una  $\lambda$  de 570 nm usando un espectrofotómetro ultrospect™ 2000 spectrophotometer (Pharmacia Biotech).

### **11.3. Técnica de Western blot.**

La activación de diferentes sustratos se evaluó después de la estimulación con insulina por la técnica de Western blot, usando 30  $\mu$ g de fracción sinaptosomal en SDS-PAGE al 10%. Después de la electroforesis las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente se lavaron las membranas dos veces con PBS, se bloquearon con una solución de PBS/leche desgrasada al 5% toda la noche a 4°C, y se incubaron con anticuerpos generados contra el sustrato del receptor de insulina-1pY<sup>612</sup> (1:1000) (Invitrogen) y AKT-pSer<sup>473</sup> (1:1000) (Cell Signaling Technology®) toda la noche a 4°C. Después de tres lavados con solución amortiguadora salina de fosfato (PBS) y Tween 20 al 0.1% por 5 min cada uno, las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios de cabra conjugados con peroxidasa de rábano generados contra IgG de ratón o de cabra, según correspondiera (1:15,000) (Santa cruz, biotechnology®, Inc.) por 1 hora a

temperatura ambiente y después detectados usando el kit ECL de quimioluminiscencia (Amersham, Arlington Heights, IL) y filmes Kodak X-Omat. Se usaron como control interno anticuerpos monoclonales generados contra  $\beta$ -actin (1:1000, clona AC-74, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, MO).

#### **11.4. Análisis estadístico.**

Todos los datos se expresan como promedio  $\pm$  error estándar. La significancia estadística se calculó con una prueba t de Student de 3-8 experimentos independientes por duplicado.

## 12. Resultados.

### 12.1. Efectos de la insulina y el péptido $\beta$ -amiloide sobre la actividad mitocondrial.

Para determinar los efectos de la insulina sobre la actividad mitocondrial incubamos sinaptosomas de corteza y de hipocampo por 15 o 60 minutos con diferentes concentraciones de insulina (10 nM, 100 nM o 1000 nM). Se produjo un incremento transitorio y significativo ( $P < 0.05$ ) de aproximadamente 20 por ciento en la producción de formazán con todas las dosis administradas de insulina en ambas regiones cerebrales, lo que se observó solamente durante los

primeros 15 min de exposición.

Posterior a 60 min de exposición,

este efecto de activación

metabólica ya no se observó

(Figura 1).

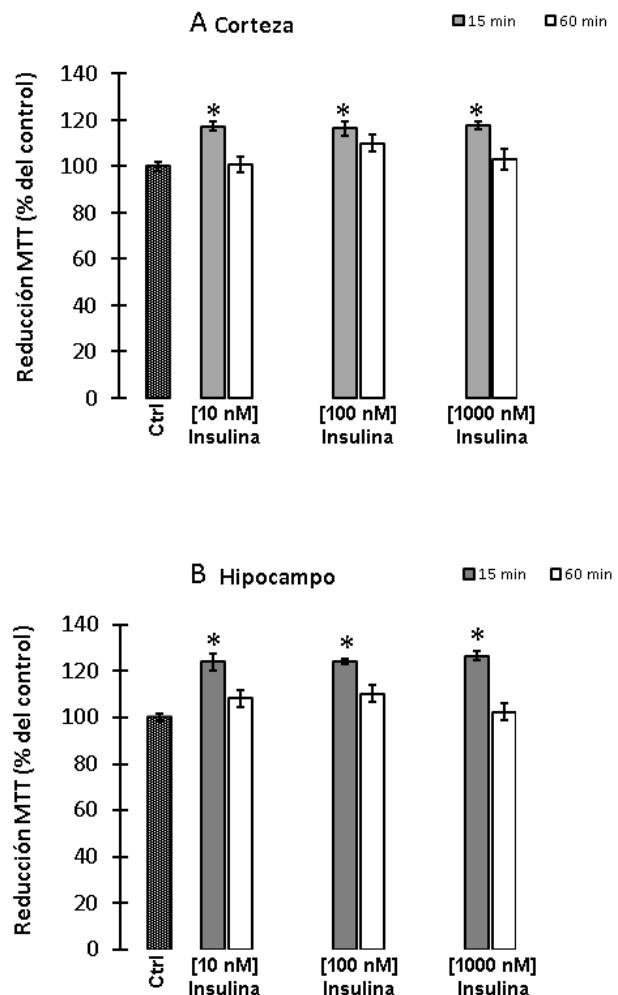
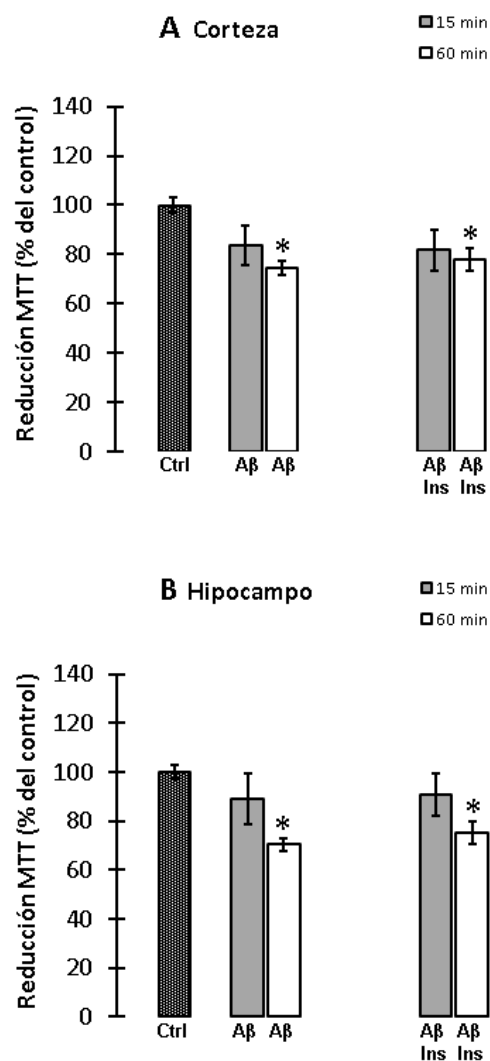


Figura 1. Efecto de la insulina sobre la función metabólica mitocondrial medida por reducción de MTT en sinaptosomas de corteza (A) e hipocampo (B) a 15 y 60 minutos. Promedio de 4 a 6 experimentos independientes por duplicado  $\pm$  error estándar. Prueba t de Student,  $*P \leq 0.05$  vs control (Ctrl).



La incubación con sólo el fragmento 25-35 del péptido  $\beta$ -amiloide reduce la actividad redox mitocondrial en sinaptosomas de hipocampo y corteza después de 60 min (35 y 25 % respectivamente;  $P < 0.05$  Fig. 2), y la activación de la actividad mitocondrial inducida por la insulina 10 nM ( $P < 0.05$ ; Figura 2 A, B).

Figura 2. Efecto del  $\beta$ A y  $\beta$ A más insulina sobre la actividad mitocondrial medida como la capacidad para reducir el MTT. Los resultados se expresan como porcentaje del control en sinaptosomas de corteza (A) e hipocampo (B) a 15 y 60 minutos de incubación. La presencia de insulina 10 nM no modifica el efecto inhibitorio del  $\beta$ A (25  $\mu$ M) sobre la reducción de MTT. Promedio de 4 a 6 experimentos independientes por duplicado  $\pm$  error estándar. Prueba t de Student,  $*P < 0.05$  vs control (sin tratamiento). A Corteza y B hipocampo.



## 12.2. La insulina activa la vía PI3K/Akt en terminales presinápticas.

La activación de la vía PI3K/Akt no ha sido estudiada previamente en las terminales presinápticas, por lo que se analizó la fosforilación de la tirosina 612 (608 en rata) del sustrato del receptor de insulina 1 (SRI-1) por inducción de la insulina, el sitio de unión de la subunidad p85 de PI3K (Hers *et al*, 2002; Gual *et al*, 2005). También se estudió si la insulina inducía la fosforilación de la cinasa Akt en la serina 473, uno de los residuos

requeridos para activar completamente Akt en presencia de insulina (Alessi *et al*, 1996). Se observó un efecto dosis dependiente significativo ( $P<0.05$ ) de la insulina sobre la fosforilación de SRI-1 y de Akt después de 10 min de incubación con insulina (Figura 3A, B). En sinaptosomas de hipocampo se logró un incremento significativo en la fosforilación del SRI-1 y Akt con concentraciones de insulina de 10 nM ( $P<0.05$ ), mientras que en sinaptosomas de corteza el efecto se observó con concentraciones de 100 nM ( $P<0.05$ ).

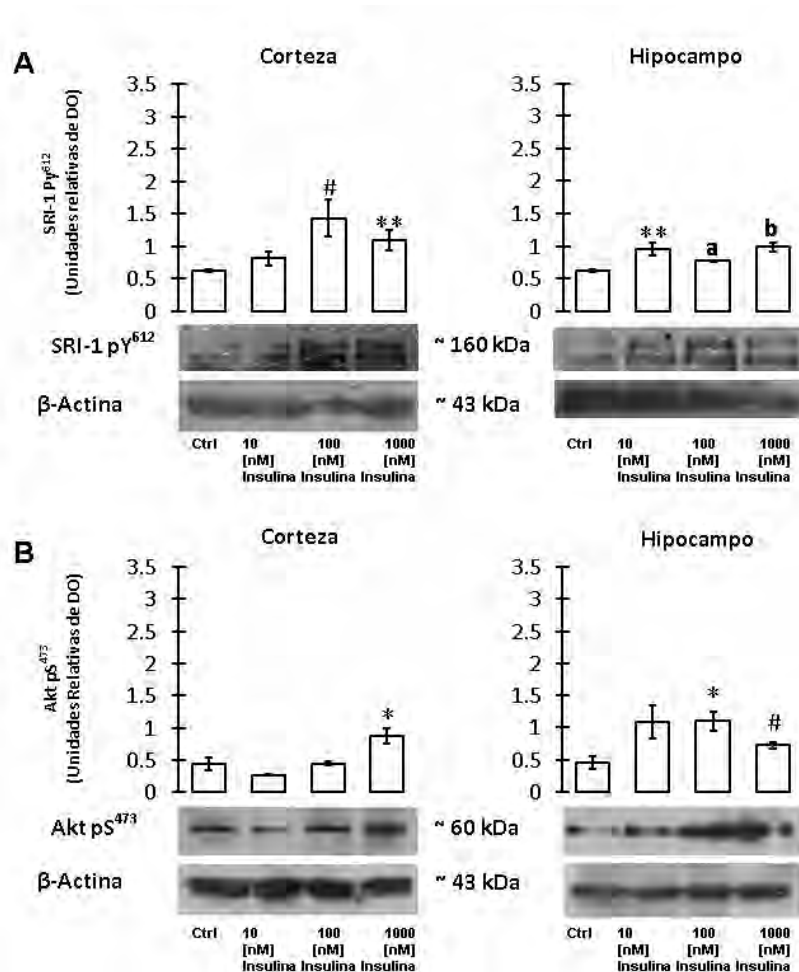


Figura 3. Efecto de la insulina sobre la fosforilación de la tirosina 612 de SRI-1 (A) y serina 473 de Akt (B) en sinaptosomas de corteza e hipocampo. Western blots representativos y análisis densitométricos. Los datos se expresan como promedio de 4 experimentos independientes por duplicado  $\pm$  error estándar. Prueba t de Student, \* $P<0.03$ ; \*\* $P<0.04$ ; # $P<0.05$ ; <sup>a</sup> $P<0.003$ ; <sup>b</sup> $P<0.007$

### **12.3. Efectos del péptido $\beta$ -amiloide sobre la activación del SRI-1 y Akt.**

Para explorar la capacidad del péptido  $\beta$ -amiloide para modular la vía Insulina/PI3K se midió la activación del SRI-1 y Akt en presencia del fragmento 25-35 del péptido  $\beta$ -amiloide de (péptido  $\beta$ -amiloide, para simplificar) por 10 min (Figura 4). Como se puede ver, el péptido  $\beta$ -amiloide induce un incremento significativo en la fosforilación del SRI-1 tanto en sinaptosomas de corteza como en sinaptosomas de hipocampo ( $P<0.02$ ; Figura 4A). Sin embargo, la fosforilación de la serina 473 de Akt solo fue significativa en sinaptosomas de hipocampo ( $P<0.03$ ; Figura 4B), sugiriendo que la vía de señalización Insulina/PI3K puede ser activada por el péptido  $\beta$ -amiloide y también que el péptido  $\beta$ -amiloide podría producir una menor sensibilidad a la insulina a través de la activación de PI3K, particularmente en el hipocampo.

### **12.4. Evaluación de la activación de SRI-1 y Akt en sinaptosomas preincubados con insulina o péptido $\beta$ -amiloide.**

Para evaluar más detalladamente los efectos del péptido  $\beta$ -amiloide sobre la señalización de insulina se preincubaron los sinaptosomas de corteza e hipocampo por 10 min con péptido  $\beta$ -amiloide 25  $\mu$ M y después se expusieron a insulina 100 nM por 10 min adicionales (Figura 4).

Con esas condiciones, la insulina produjo un incremento significativo en la fosforilación de SRI-1 ( $P<0.05$ ; Figura 4A) y Akt ( $P<0.05$ ; Figura 4b) sobre los efectos producidos solamente por péptido  $\beta$ -amiloide en sinaptosomas de corteza. Sin embargo, no hubo un mayor incremento en la activación del SRI-1 y Akt inducida por el péptido  $\beta$ -amiloide en sinaptosomas de corteza e hipocampo preincubados con insulina, lo que sugiere la insulina

no es capaz de activar al SRI-1 y Akt, en esta fracción de sinaptosomas cuando el receptor de insulina está ocupado previamente con el péptido  $\beta$ -amiloide. De acuerdo con esto, cuando los sinaptosomas de corteza e hipocampo se incuban previamente con insulina, se ve un incremento dos veces o tres veces mayor en la fosforilación del SRI-1 y Akt, después de la exposición al péptido  $\beta$ -amiloide ( $P<0.05$ ), sugiriendo que la activación del SRI-1 y Akt mediada por la insulina es potenciada en presencia del péptido  $\beta$ -amiloide (Figura 4A, B comparada con Figura 3A, B).

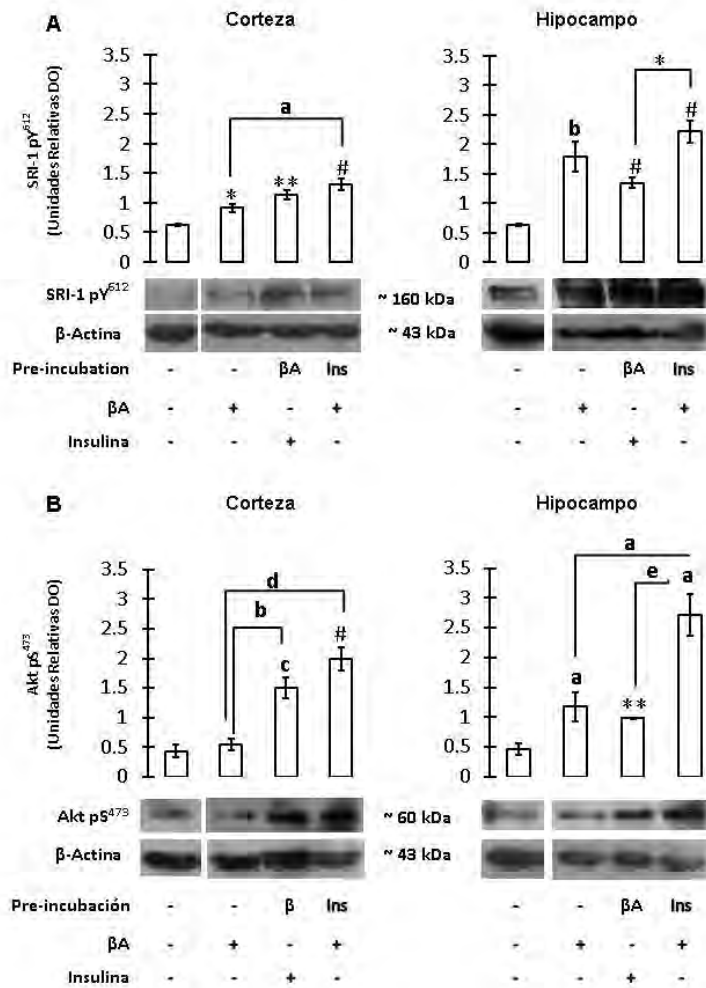


Figura 4. Efecto de la insulina y del péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta A$ ) sobre la fosforilación de la tirosina 612 del SRI-1 (A) y de la serina 473 de Akt (B). Los sinaptosomas de corteza e hipocampo fueron preincubados 10 min con insulina (100 nM) o  $\beta A$  (25  $\mu M$ ) y expuestos por 10 min adicionales a  $\beta A$  o insulina. Western blot representativo y análisis densitométrico. Promedios  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes. T-Student, \*p<0.02, \*\*p<0.004, #p<0.002, <sup>a</sup>p<0.03, <sup>b</sup>p<0.01, <sup>c</sup>p<0.007, <sup>d</sup>p<0.003, <sup>e</sup>p<0.04. Ins insulina,  $\beta A$   $\beta$ -amiloide.

### 13. Discusión.

Los resultados obtenidos demuestran que las terminales nerviosas presinápticas son activadas por insulina y que el péptido  $\beta$ -amiloide modula la activación del sustrato del receptor de insulina 1 (SRI-1) y la cinasa Akt, dependientes de insulina. La insulina incrementa la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales, evaluada con el ensayo de MTT, de forma transitoria, actividad que alcanzó un efecto máximo con una concentración de insulina de 10 nM, durante 15 minutos de exposición (Figura 1). La activación de la piruvato deshidrogenasa mitocondrial, se ha observado anteriormente en adipocitos tratados con insulina, en donde se produce un incremento de calcio mitocondrial que activa el sistema de la piruvato deshidrogenasa (McDonald *et al*, 1976; Epping *et al*, 1983). Además, la actividad de la piruvato deshidrogenasa en la mitocondria de adipocitos disminuye en presencia de ATP (Seals y Jarett, 1980), lo que apoya la activación transitoria de las deshidrogenasas.

La actividad de las deshidrogenasas mitocondriales incrementa con el flujo glucolítico, y aunque el transportador de glucosa 4 (GLUT4) no es el principal transportador de glucosa en neuronas (Benomar *et al*, 2006), excluyendo la posibilidad de un efecto directo de la insulina sobre la captura de glucosa, el aumento en la función mitocondrial observado en estos experimentos, sugiere un efecto positivo de la insulina en el control de la homeostasis energética en los sinaptosomas. Además, Huang y cols., han observado que la incubación con insulina 1 nM incrementa el potencial de la membrana interna mitocondrial, lo que correlaciona con un incremento en la producción de ATP, del flujo glucolítico y el potencial redox mitocondrial en cultivos neuronales (Huang *et al*, 2005). Más aun, hay evidencia de que la insulina neuronal promueve la actividad glucolítica dependiente de la

vía PI3K y la cinasa Akt. En la línea celular SH-5YSY, GLUT4, incrementa casi 5 veces más en la membrana plasmática después de la estimulación con insulina 100 nM por 15 minutos, y su transporte es dependiente de la vía PI3K, como se ha demostrado al inhibir con wortmanina (inhibidor específico de PI3K). Además, las incubaciones crónicas con insulina inhiben la expresión tanto de GLUT4 y GLUT3 en la línea celular SH-5YSY lo que disminuye la captura de glucosa (Benomar *et al*, 2006). Esto sugiere que la exposición a insulina por periodos cortos, favorece la captura de glucosa y su metabolismo en células neuronales. La insulina también puede activar la vía de señalización del factor de crecimiento 1 semejante a la insulina (IGF1) por homología de sus receptores. En este sentido, los ratones *igf1*<sup>-/-</sup>, que no producen IGF1, muestran una reducción en la expresión cerebral de GLUT4, una captura reducida de glucosa en sinaptosomas y, de manera importante, muestran una reducida fosforilación de Akt (Cheng *et al*, 2000). También, en neuronas de hipocampo, activadas con bicuculina 50  $\mu$ M y 4-aminopiridina 100  $\mu$ M, lo que produce explosiones de potenciales de acción, mediadas por receptores para N-metil D-aspartato (NMDA), se activa la cinasa Akt (blanco de PI3K). Esto lleva a la fosforilación de la sintetasa de óxido nítrico neuronal (nNOS) en la serina 1412 y promueve la producción de óxido nítrico, produciendo un incremento de 5 veces de en el transportador de glucosa 3 (GLUT3) en la superficie neuronal desde los 15 minutos después del tratamiento, a través de un mecanismo mediado por monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) (Ferreira *et al*, 2011). Por lo que un incremento en el transporte de glucosa mediado por la estimulación de la vía Insulina/PI3K es un mecanismo probable para explicar el incremento en la reducción de MTT en nuestro modelo.

La insulina ejerce su efecto principalmente al unirse y activar su receptor lo cual puede promover la fosforilación del sustrato del receptor de insulina 1 (SRI-1), el cual a su vez promueve la activación de la cinasa de fosfo inositidos PI3K y la fosforilación de Akt. En estos experimentos la insulina promovió la fosforilación del SRI-1 en la tirosina 612 y la serina 473 de Akt. La tirosina 612 del SRI-1 es un sitio de anclaje para cinasas con dominio SH2, como los de PI3K (Esposito et al, 2001; Greene et al, 2004). Por otro lado, la fosforilación de la serina 473 de la cinasa Akt, indica la completa activación de Akt (Sarbasov *et al*, 2005) y cuya fosforilación es requerida para la máxima activación de efectores río debajo de los complejos PI3k/mTORC2 (Pearce *et al*, 2010).

El péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A) se ha asociado al daño sináptico y pudiera estar implicado en alteraciones de la función sináptica previas al daño estructural. Una especie particularmente tóxica del  $\beta$ A es el fragmento 25-35 ( $\beta$ A<sup>25-35</sup>), el cual se ha demostrado que produce peroxidación de lípidos en la parte interna de la bicapa lipídica, pero no en la interfase lípido-acuosa de las membranas lipídicas en tan solo minutos de exposición al péptido (Butterfield *et al*, 1994). También se ha demostrado que el  $\beta$ A<sup>25-35</sup> afecta la actividad de la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  e incrementa la concentración de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular, en cultivos de hipocampo de rata y sinaptosomas de hipocampo humano, al incrementar la entrada de  $\text{Na}^+$  y despolarizar las sinapsis neuronales y de esa manera incrementar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, llevando a la muerte neuronal (Mark *et al*, 1995). Además, estudios previos han demostrado que el daño en corteza e hipocampo de ratas, debido a la toxicidad del  $\beta$ A<sup>25-35</sup>, se exagera cuando las neuronas o sinaptosomas son expuestos a iodoacetato y ácido 3-nitropropiónico, sugiriendo que la homeostasis energética es importante para la protección neuronal (Arias *et al*, 2002). En estos experimentos mostramos que los

sinaptosomas de corteza e hipocampo, expuestos a 25  $\mu\text{M}$  de  $\beta\text{A}^{25-35}$ , disminuyeron su actividad mitocondrial después de 60 minutos de exposición pero no a los 15 minutos.

Evidencia previa ha asociado al péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta\text{A}$ ) en modificaciones de la señalización de insulina, posiblemente al interactuar con el receptor de insulina (Xie et al, 2002; Zhao et al, 2008), lo cual conduce a cambios en la plasticidad sináptica y supervivencia neuronal. Recientemente, se demostró que el péptido  $\beta$ -amiloide intraneuronal puede interferir entre la interacción de la proteína cinasa dependiente de 3-fosfoinositidos PDK1 y la cinasa Akt, previniendo la activación de la cinasa Akt (Lee et al, 2009). En el presente trabajo, se demostró que la incubación de sinaptosomas con péptido  $\beta\text{A}$  induce la fosforilación del sustrato del receptor de insulina 1 (SRI-1) en sinaptosomas de corteza e hipocampo, pero este efecto sobre el SRI-1 solo lleva a la activación significativa de Akt en sinaptosomas de hipocampo. Ya que el péptido  $\beta\text{A}$  se ha encontrado en sitios con receptor de insulina en las terminales sinápticas, los presentes resultados sugieren un efecto novedoso de la modulación dependiente del péptido  $\beta\text{A}$  en la función sináptica, particularmente en el hipocampo, el cual tiene una mayor densidad de receptores de insulina (Abbott et al, 1999). Es de notar que los efectos del péptido  $\beta\text{A}$  sobre la activación de la cinasa Akt, en un residuo asociado con el desarrollo de resistencia a insulina, puede representar una asociación de los mecanismos moleculares entre la resistencia a la insulina y aspectos fisiológicos de la enfermedad de Alzheimer a nivel presináptico. Además, se han encontrado niveles elevados de fosfo-serina 473 Akt en cerebros con enfermedad de Alzheimer (Griffin et al, 2005). Apoyando la relación entre el péptido  $\beta\text{A}$  y las modificaciones en la vía PI3K/Akt.



Se analizaron dos condiciones donde el receptor de insulina fue previamente incubado con péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A) o insulina, y posteriormente incubados en presencia de uno de los dos compuestos. En estos experimentos se encontró un incremento importante en la fosforilación tanto en el sustrato del receptor de insulina (SRI-1) como en la cinasa Akt, cuando se incubó con insulina antes que con péptido  $\beta$ A, y de manera particular en sinaptosomas de hipocampo. Sin embargo cuando se incubó previamente con el péptido  $\beta$ A, los efectos de la insulina se redujeron. Estos resultados sugieren que la modulación negativa de la actividad de insulina depende probablemente de la unión del péptido  $\beta$ A al receptor de insulina y su consecuente redistribución, como se ha sugerido con anterioridad (Zhao *et al*, 2008).

Así, aunque la amplia gama de consecuencias del péptido  $\beta$ -amiloide sobre la acción de la insulina en terminales presinápticas queda por ser determinada, parece que el  $\beta$ A induce una respuesta reducida a la insulina. Lo anterior, sumado al elevado riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer cuando se presenta resistencia a insulina, sugiere que los mecanismos iniciales que dañan el mantenimiento sináptico, podrían empezar con alteraciones en la función de los receptores de insulina cerebrales, ya que los receptores de insulina en el cerebro están desensibilizados en etapas iniciales de la EA.

## 14. Conclusiones.

En el presente trabajo se demostró que:

- La insulina aumenta la actividad metabólica sinaptosomal de manera transitoria a tiempos cortos de exposición.
- El fragmento 25-35 del péptido  $\beta$ -amiloide disminuye la actividad metabólica sinaptosomal e inhibe la acción de la insulina sobre la actividad metabólica sinaptosomal de corteza e hipocampo.
- La insulina activa al sustrato del receptor de insulina SRI-1 y a la cinasa Akt, al incrementar su fosforilación en sinaptosomas de corteza e hipocampo.
- La exposición al péptido  $\beta$ -amiloide también promueve la fosforilación del sustrato del receptor de insulina SRI-1 y a la cinasa Akt, lo que sugiere que el  $\beta$ A podría actuar como modulador de la vía Insulina/PI3K.
- La preincubación con péptido  $\beta$ -amiloide afecta la sensibilidad a la insulina, al disminuir los efectos de la insulina sobre la fosforilación del sustrato del receptor de insulina SRI-1 y a la cinasa Akt.

## 15. Referencias.

Abbott M.A., Wells D.G., Fallon J.R. (1999) The insulin receptor tyrosine kinase substrate p58/53 and the insulin receptor are components of CNS synapses. *J Neurosci.* 19, 7300-7308.

Accili D., Arden K.C. (2004) FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell.* 117, 421-426.

Akbar M., Calderon F., Wen Z., Kim H.Y. (2005) Docosahexaenoic acid: A positive modulator of Akt signaling in neuronal survival. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102, 10858-10863.

Akiyama H., Kamiguchi H. (2010) Phosphatidylinositol 3-kinase facilitates microtubule-dependent membrane transport for neuronal growth cone guidance. *Biol Chem.* 285, 41740-41748.

Alessi D.R., Andjelkovic M., Caudwell B., Cron P., Morrice N., Cohen P., Hemmings B.A. (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 15, 6541-6551.

Andersen J.M., Myhre O., Fonnum F. (2003) Discussion of the role of the extracellular signal-regulated kinase-phospholipase A2 pathway in production of reactive oxygen species in Alzheimer's disease. *Neurochem Res.* 28, 319-326.

Arias C., Montiel T., Quiroz-Baez R., Massieu L. (2002)  $\beta$ -Amyloid neurotoxicity is exacerbated during glycolysis inhibition and mitochondrial impairment in the rat hippocampus *in vivo* and in isolated nerve terminals: Implications for Alzheimer's disease. *Experimental Neurology.* 176, 163–174.

Avila J. (2006) Tau phosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease pathology. *FEBS Lett.* 580, 2922-2927.

Bayer T.A., Wirths O., Majtényi K., Hartmann T., Multhaup G., Beyreuther K., Czech C. (2001) Key factors in Alzheimer's disease:  $\beta$ -amyloid precursor protein processing, metabolism and intraneuronal transport. *Brain Pathol.* 1, 1-11.

Benomar Y., Naour N., Aubourg A., Bailleux V., Gertler A., Djiane J., Guerre-Millo M., Taouis M. (2006) Insulin and leptin induce Glut4 plasma membrane translocation and glucose uptake in a human neuronal cell line by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Endocrinology.* 147(5), 2550-2556.

Bittner T., Fuhrmann M., Burgold S., Ochs S.M., Hoffmann N., Mitteregger G., Kretzschmar H., La Ferla F.M., Herms J. (2010) Multiple events lead to dendritic spine loss in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *PLoS One*. 5, e15477.

Blennow K., de Leon M.J., Zetterberg H. (2006) Alzheimer's disease. *Lancet*. 368, 387-403.

Bloch-Damti A., Potashnik R., Gual P., Le Marchand-Brustel Y., Tanti J.F., Rudich A., Bashan N. (2006) Differential effects of IRS1 phosphorylated on Ser307 or Ser632 in the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Diabetologia*. 49(10), 2463-2473.

Bruel-Jungerman E., Veyrac A., Dufour F., Horwood J., Laroche S., Davis S. (2009) Inhibition of PI3K-Akt signaling blocks exercise-mediated enhancement of adult neurogenesis and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *PLoS One*. 4, e7901.

Bulbarelli A., Lonati E., Cazzaniga E., Re F., Sesana S., Barisani D., Sancini G., Mutoh T., Masserini M. (2009) TrkA pathway activation induced by amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ). *Mol Cell Neurosci*. 40, 365-373.

Burgering B.M., Kops G.J., (2002) Cell cycle and death control: long live Forkheads. *Trends Biochem Sci*. 27, 352-360.

Butterfield D.A., Hensley K., Harris M., Mattson M., Carney J. (1994)  $\beta$ -Amyloid peptide free radical fragments initiate synaptosomal lipoperoxidation in a sequence-specific fashion: implications to Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 200, 710-715.

Caporaso G.L., Gandy S.E., Buxbaum J.D., Greengard P. (1992) Chloroquine inhibits intracellular degradation but not secretion of Alzheimer B/A4 amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89, 2252-2256.

Carson J.A., Turner A.J. (2002)  $\beta$ -amyloid catabolism: roles for neprilysin (NEP) and other metallopeptidases? *J Neurochem.* 81, 1–8.

Caselli R.J., Beach T.G., Yaari R., Reiman E.M. (2006) Alzheimer's disease a century later. *J Clin Psychiatry.* 67, 1784-1800.

Cheng C.M., Reinhardt R.R., Lee W.H., Joncas G., Patel S.C., Bondy C.A. (2000) Insulin-like growth factor 1 regulates developing brain glucose metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97, 10236-10241.

Cheng G., Yu Z., Zhou D., Mattson M.P. (2002) Phosphatidylinositol-3-Kinase-Akt Kinase and p42/p44 Mitogen-Activated Protein Kinases mediate neurotrophic and excitoprotective actions of a secreted form of Amyloid Precursor Protein. *Exp Neurol.* 175, 407-414.

Coleman P.D., Yao P.J. (2003) Synaptic slaughter in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 24, 1023-1027.

Collado M., Medema R.H., Garcia-Cao I., Dubuisson M.L., Barradas M., Glassford J., Rivas C., Burgering B.M., Serrano M., Lam E.W. (2000) Inhibition of the Phosphoinositide 3-Kinase Pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1. *J Biol Chem*. 275, 21960-21968.

Costantini C., Scrable H., Puglielli L. (2006) An aging pathway controls the TrkA to p75NTR receptor switch and amyloid  $\beta$ -peptide generation. *EMBO J*. 25, 1997-2006.

Davies C.A., Mann D.M.A., Sumpter P.Q., Yates P.O. (1987) A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's Disease. *J Neurol Sci*. 78, 151-164.

De la Monte S.M. (2009) Insulin resistance and Alzheimer's disease. *BMB Rep*. 42, 475-481.

Di Paolo S., Teutonico A., Leogrande D., Capobianco C., Schena P.F. (2006) Chronic inhibition of mammalian target of rapamycin signaling downregulates insulin receptor substrates 1 and 2 and AKT activation: A crossroad between cancer and diabetes? *J Am Soc Nephrol*. 17, 2236-2244.

Engelman J.A., Luo J., Cantley L.C. (2006) The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet.* 7, 606-619.

Epping R.J., Taylor W.M., Bygrave F.L. (1983) Characterization of  $\text{Ca}^{2+}$  transport activity by white adipose tissue mitochondria. *FEBS Lett.* 158, 21-26.

Esposito D.L., Li Y., Cama A., Quon M.J. (2001) Tyr(612) and Tyr(632) in human insulin receptor substrate-1 are important for full activation of insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase activity and translocation of GLUT4 in adipose cells. *Endocrinology.* 142, 2833-2840.

Farfara D., Lifshitz V., Frenkel D. (2008) Neuroprotective and neurotoxic properties of glial cells in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med.* 12, 762-780.

Ferreira J.M., Burnett A.L., Rameau G.A. (2011) Activity-dependent regulation of surface glucose transporter-3. *J Neurosci.* 31, 1991-1999.

Ferrer I., Gullotta F. (1990) Downs-Syndrome and Alzheimer's-Disease-Dendritic spine counts in the hippocampus. *Acta Neuropathol.* 79, 680-685.

Frölich L., Blum-Degen D., Bernstein H.G., Engelsberger S., Humrich J., Laufer S., Muschner D., Thalheimer A., Türk A., Hoyer S., Zöchling R., Boissl K.W., Jellinger K.,



Riederer P. (1998) Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 105, 423-438.

Frozza R.L., Horn A.P., Hoppe J.B., Simão F., Gerhardt D., Comiran R.A., Salbego C.G. (2009) A comparative study of  $\beta$ -amyloid peptides A $\beta$ 1-42 and A $\beta$ 25-35 toxicity in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurochem Res.* 34, 295-303.

Gandy S. (2005) The role of cerebral amyloid  $\beta$  accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J Clin Invest.* 115, 1121-1129.

Gasparini L., Netzer W.J., Greengard P., Xu H. (2002) Does insulin dysfunction play a role in Alzheimer's disease? *Trends Pharmacol Sci.* 23, 288-293.

Gerozissis K. (2003) Brain insulin: regulation, mechanisms of action and functions. *Cell Mol Neurobiol.* 23,1-25.

Gerozissis K. (2008) Brain insulin, energy and glucose homeostasis; genes, environment and metabolic pathologies. *Eur J Pharmacol.* 585, 38-49.

Giordanod V. (2007) Systemic and brain metabolic dysfunction as a new paradigm for approaching Alzheimer's dementia. *Neurochem Res.* 32, 555-567.

Greene M.W., Morrice N., Garofalo R.S., Roth R.A. (2004) Modulation of human insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by protein kinase C delta. *Biochem J.* 378,105-116.

Greer E.L., Brunet A. (2005) FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene.* 24, 7410-7425.

Griffin R.J., Moloney A., Kelliher M., Johnston J.A., Ravid R., Dockery P., O'Connor R., O'Neill C. (2005) Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology. *J Neurochem.* 93, 105-117.

Gual P., Le Marchand-Brustel Y, Tanti J.F. (2005) Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie.* 87(1), 99-109.

Gylys K.H., Fein J.A., Yang F., Wiley D.J., Miller C.A., Cole G.M. (2004) Synaptic changes in Alzheimer's disease: increased amyloid- $\beta$  and gliosis in surviving terminals is accompanied by decreased PSD-95 fluorescence. *Am J Pathol.* 165, 1809-1817.

Haass C., Schlossmacher M.G., Hung A.Y., Vigo-Pelfrey C., Mellon A., Ostaszewski B.L., Lieberburg I., Koo E.H., Schenk D., Teplow D.B., Selkoe D.J. (1992) Amyloid  $\beta$ -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature.* 359, 322-325.

Harrington L.S., Findlay G.M., Gray A., Tolkacheva T., Wigfield S., Rebholz H., Barnett J., Leslie N.R., Cheng S., Shepherd P.R., Gout I., Downes C.P., Lamb R.F. (2004) The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J Cell Biol.* 166, 213-223.

Havrankova J., Roth J., Brownstein M.J. (1979) Concentrations of insulin and insulin receptors in the brain are independent of peripheral insulin levels studies of obese and streptozotocin-treated rodents. *J Clin Invest.* 64, 636-642.

Hers I., Bell C.J., Poole A.W., Jiang D., Denton R.M., Schaefer E., Tavaré J.M. (2002) Reciprocal feedback regulation of insulin receptor and insulin receptor substrate tyrosine phosphorylation by phosphoinositide 3-kinase in primary adipocytes. *Biochem J.* 368, 875-884.

Ho L., Qin W., Pompl P.N., Xiang Z., Wang J., Zhao Z., Peng Y., Cambareri G., Rocher A., Mobbs C.V., Hof P.R., Pasinetti G.M. (2004) Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* 18, 902-904.

Horwood J.M., Dufour F., Laroche S., Davis S. (2006) Signaling mechanisms mediated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade in synaptic plasticity and memory in the rat. *Eur J Neurosci.* 23, 3375-3384.

Hoyer S. (1998) Is sporadic Alzheimer disease the brain type of non-insulin dependent diabetes mellitus? A challenging hypothesis. *J Neural Transm.* 105, 415-422.

Hoyer S. (2002) The aging brain. Changes in the neuronal insulin/insulin receptor signal transduction cascade trigger late-onset sporadic Alzheimer disease (SAD). A mini-review. *J Neural Transm.* 109, 991-1002.

Hoyer S. (2004) Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease. *Eur J Pharmacol.* 490, 115-125.

Hoyer S., Lannert H., Nöldner M., Chatterjee S.S. (1999) Damaged neuronal energy metabolism and behavior are improved by Ginkgo biloba extract (EGb 761). *J Neural Transm.* 106, 1171-1188.

Hsieh H., Boehm J., Sato C., Iwatsubo T., Tomita T., Sisodia S., Malinow R. (2006) AMPAR removal underlies A $\beta$ -induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron.* 52, 831-843.

Huang T.J., Verkhratsky A., Fernyhough P. (2005) Insulin enhances mitochondrial inner membrane potential and increases ATP levels through phosphoinositide 3-kinase in adult sensory neurons. *Mol Cell Neurosci.* 28, 42-54.

Instituto nacional para el envejecimiento, de los institutos nacionales de salud de los E.E.U.U., Progress report on Alzheimer's Disease, 2010, 73 Pp.

Je H.S., Ji Y., Wang Y., Yang F., Wu W., Lu B. (2011) Presynaptic protein synthesis required for NT-3-induced long-term synaptic modulation. *Mol Brain*. 4, 1-8.

Je H.S., Lu Y., Yang F., Nagappan G., Zhou J., Jiang Z., Nakazawa K., Lu B. (2009) Chemically inducible inactivation of protein synthesis in genetically targeted neurons. *J Neurosci*. 29, 6761-6766.

Joep R.S., Johnson G.V. (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci*. 29, 95-102.

Kaether C., Schmitt S., Willem M., Haass C. (2006) Amyloid precursor protein and Notch intracellular domains are generated after transport of their precursors to the cell surface. *Traffic*. 7, 408-415.

Kenyon C. (2005) The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell*. 120, 449-460.

Khamzina L., Veilleux A., Bergeron S., Marette A. (2005) Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: Possible involvement in obesity-linked insulin resistance. *Endocrinology*. 146, 1473-1481.

Lacor P.N. (2007) Advances on the understanding of the origins of synaptic pathology in AD. *Current Genomics*. 8, 486-508.

Lacor P.N., Buniel M.C., Chang L., Fernandez S.J., Gong Y., Viola K.L., Lambert M.P., Velasco P.T., Bigio E.H., Finch C.E., Krafft G.A., Klein W.L. (2004) Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid  $\beta$  oligomers. *J Neurosci*. 24, 10191-10200.

Lazarov O., Lee M., Peterson D.A., Sisodia S.S. (2002) Evidence that synaptically released  $\beta$ -amyloid accumulates as extracellular deposits in the hippocampus of transgenic mice. *J Neurosci*. 22, 9785-9793.

Lee C.C., Huang C.C., Wu M.Y., Hsu K.S. (2005) Insulin stimulates postsynaptic density-95 protein translation via the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway. *J Biol Chem*. 280, 18543-18550.

Lee H.K., Kumar P., Fu Q., Rosen K.M., Querfurth H.W. (2009) The insulin/Akt signaling pathway is targeted by intracellular  $\beta$ -amyloid. *Mol Biol Cell*. 20, 1533-1544.

Li L., Hölscher C. (2007) Common pathological processes in Alzheimer disease and type 2 diabetes: a review. *Brain Res Rev*. 56, 384-402.

Lim G.P., Calon F., Morihara T., Yang F., Teter B., Ubeda O., Salem N. Jr., Frautschy S.A., Cole G.M. (2005) A diet enriched with the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid reduces amyloid burden in an aged Alzheimer mouse model. *J Neurosci.* 25, 3032-3040.

Ling Y., Morgan K., Kalsheker N. (2003) Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 35, 1505-1535.

Linseman D.A., Phelps R.A., Bouchard R.J., Le S.S., Laessig T.A., McClure M.L., Heidenreich K.A. (2002) Insulin-like growth factor-I blocks Bcl-2 interacting mediator of cell death (Bim) induction and intrinsic death signaling in cerebellar granule neurons. *J Neurosci.* 22, 9287-9297.

Löscher W., Böhme G., Müller F., Pagliusi S. (1985) Improved method for isolating synaptosomes from 11 regions of one rat brain: electron microscopic and biochemical characterization and use in the study of drug effects on nerve terminal gamma-aminobutyric acid in vivo. *J Neurochem.* 45, 879-889.

Lue L.F., Kuo Y.M., Roher A.E., Brachova L., Shen Y., Sue L., Beach T., Kurth J.H., Rydel R.E., Rogers J. (1999) Soluble amyloid  $\beta$  peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 155, 853-862.

Man H.Y., Wang Q., Lu W.Y., Ju W., Ahmadian G., Liu L., D'Souza S., Wong T.P., Taghibiglou C., Lu J., Becker L.E., Pei L., Liu F., Wymann M.P., MacDonald J.F., Wang Y.T. (2003) Activation of PI3-kinase is required for AMPA receptor insertion during LTP of mEPSCs in cultured hippocampal neurons. *Neuron*. 38, 611-624.

Mark R.J., Hensley K., Butterfield D.A., Mattson M.P. (1995) Amyloid P-Peptide impairs ion-motive ATPase activities: evidence for a role in loss of neuronal Ca<sup>2+</sup> homeostasis and cell death. *J Neurosci*. 15, 6239-6249.

Matsuzaki T., Sasaki K., Tanizaki Y., Hata J., Fujimi K., Matsui Y., Sekita A., Suzuki S.O., Kanba S., Kiyohara Y., Iwaki T. (2010) Insulin resistance is associated with the pathology of Alzheimer disease: the Hisayama study. *Neurology*. 75, 764-770.

McDonald J.M., Bruns D.E., Jarett L. (1976) The ability of insulin to alter the stable calcium pools of isolated adipocyte subcellular fractions. *Biochem Biophys Res Commun*. 71, 114-121.

Meske V., Albert F., Ohm T.G. (2008) Coupling of mammalian target of rapamycin with phosphoinositide 3-kinase signaling pathway regulates protein phosphatase 2A- and glycogen synthase kinase-3-dependent phosphorylation of tau. *J Biol Chem*. 283, 100-109.



Morris J.C., Storandt M., Miller J.P., McKeel D.W., Price J.L., Rubin E.H., Berg L. (2001) Mild cognitive impairment represents early-stage Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 58, 397-405.

Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65, 55-63.

Mucke L., Masliah E., Yu G.Q., Mallory M., Rockenstein E.M., Tatsuno G., Hu K., Kholodenko D., Johnson-Wood K., McConlogue L. (2000) High-level neuronal expression of A $\beta$  1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci.* 20, 4050-4058.

Mungarro-Menchaca X., Ferrera P., Morán J., Arias C. (2002)  $\beta$ -Amyloid peptide induces ultrastructural changes in synaptosomes and potentiates mitochondrial dysfunction in the presence of ryanodine. *J Neurosci Res.* 68, 89-96.

Nelson T., Alkon D. (2005) Insulin and cholesterol pathways in neuronal function, memory and neurodegeneration. *Biochem Soc Trans.* 33(Pt 5), 1033-1036.

Niessen M., Jaschinski F., Item F., McNamara M.P., Spinaz G.A., Trüb T. (2007) Insulin receptor substrates 1 and 2 but not Shc can activate the insulin receptor independent of insulin and induce proliferation in CHO-IR cells. *Exp Cell Res.* 313, 805-815.

Nussey S., Whitehead S. (2001) *Endocrinology: An Integrated Approach*. Oxford: BIOS Scientific Publishers; Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK30/>

Oddo S., Caccamo A., Shepherd J.D., Murphy M.P., Golde T.E., Kaye R., Metherate R., Mattson M.P., Akbari Y., LaFerla F.M. (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A $\beta$  and synaptic dysfunction. *Neuron*. 39, 409-421.

Pearce L.R., Komander D., Alessi D.R. (2010) The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11, 9-22.

Peltier J., O'Neill A., Schaffer D.V. (2007) PI3K/Akt and CREB regulate adult neural hippocampal progenitor proliferation and differentiation. *Dev Neurobiol*. 67, 1348-1361.

Plum L., Belgardt B.F., Brüning J.C. (2006) Central insulin action in energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest*. 116, 1761-1766.

Rajendran L., Honsho M., Zahn T.R., Keller P., Geiger K.D., Verkade P. (2006) Alzheimer's disease  $\beta$ -amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103, 11172-11177.

Ray S., Britschgi M., Herbert C., Takeda-Uchimura Y., Boxer A., Blennow K., Friedman L.F., Galasko D.R., Jutel M., Karydas A., Kaye J.A., Leszek J., Miller B.L., Minthon L.,

Quinn J.F., Rabinovici G.D., Robinson W.H., Sabbagh M.N., So Y.T., Sparks D.L., Tabaton M., Tinklenberg J., Yesavage J.A., Tibshirani R., Wyss-Coray T. (2007) Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nat Med.* 13, 1359–1362.

Ren R., Zhang Y., Li B., Wu Y., Li B. (2011) Effect of  $\beta$ -amyloid (25-35) on mitochondrial function and expression of mitochondrial permeability transition pore proteins in rat hippocampal neurons. *J Cell Biochem.* 112, 1450-1457.

Rodgers E.E., Theibert A.B. (2002) Functions of PI3-kinase in development of the nervous system. *Int J Dev Neurosci.* 20, 187-197.

Rowan M.J., Klyubin I., Wang Q., Anwyl R. (2005) Synaptic plasticity disruption by amyloid  $\beta$  protein: modulation by potential Alzheimer's disease modifying therapies. *Biochem Soc Trans.* 33, 563-567.

Samochocki M. (1998) Aging and  $\beta$ -amyloid peptides decrease cholinergic receptor-mediated calcium increase in brain cortex synaptoneurosomes. *Acta Neurobiol Exp.* 58, 3-11.

Sarbassov D.D., Guertin D.A., Ali S.M., Sabatini D.M. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 307, 1098-1101.

Scheff S.W., Price D.A. (2003) Synaptic pathology in Alzheimer's disease: a review of ultrastructural studies. *Neurobiol Aging*. 24, 1029-1046.

Schrijvers E.M., Witteman J.C., Sijbrands E.J., Hofman A., Koudstaal P.J., Breteler M.M. (2010) Insulin metabolism and the risk of Alzheimer disease: the Rotterdam Study. *Neurology*. 75, 1982-1987.

Seals J.R., Jarett L. (1980) Activation of pyruvate dehydrogenase by direct addition of insulin to an isolated plasma membrane/mitochondria mixture: evidence for generated of insulin's second messenger in a subcellular system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 77, 77-81.

Selkoe D. (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*. 298, 789-791.

Shah O.J., Wang Z.Y., Hunter T. (2004) Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies. *Curr Biol*. 14, 1650-1656.

Shankar G.M., Bloodgood B.L., Townsend M., Walsh D.M., Selkoe D.J., Sabatini B.L. (2007) Natural oligomers of the Alzheimer amyloid- $\beta$  protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci*. 27, 2866-2875.

Shin B.C., Suzuki M., Inukai K., Anai M., Asano T. Takata K. (1998) Multiple isoforms of the regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) are expressed in neurons in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 246, 313-319.

Sima A.A. (2010) Encephalopathies: the emerging diabetic complications. *Acta Diabetol.* 47, 279-293.

Small D.H. (2004) Mechanisms of synaptic homeostasis in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 1, 27-32.

Snyder E.M., Nong Y., Almeida C.G., Paul S., Moran T., Choi E.Y., Nairn A.C., Salter M.W., Lombroso P.J., Gouras G.K., Greengard P. (2005) Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- $\beta$ . *Nat Neurosci.* 8, 1051-1058.

Stützer I., Esterházy D., Stoffel M. (2012) The pancreatic beta cell surface proteome. *Diabetologia.* 55, 1877-89.

Sui L., Wang J., Li B.M. (2008) Role of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of the rapamycin signaling pathway in long-term potentiation and trace fear conditioning memory in rat medial prefrontal cortex. *Learn Mem.* 15, 762-776.

Tang S.J., Reis G., Kang H., Gingras A.C., Sonenberg N., Schuman E.M. (2002) A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99, 467-472.

Tanzi R.E., Moir R.D., Wagner S.L. (2004) Clearance of Alzheimer's A $\beta$  peptide: the many roads to perdition. *Neuron*. 43, 605-608.

Terry R.D., Masliah E., Salmon D.P., Butters N., DeTeresa R., Hill R., Hansen L.A., Katzman R. (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol*. 30, 572-580.

Thornton C., Bright N.J., Sastre M., Muckett P.J., Carling D. (2011) AMP-activated protein kinase (AMPK) is a tau kinase, activated in response to amyloid  $\beta$ -peptide exposure. *Biochem J*. 434, 503-512.

Townsend M., Mehta T., Selkoe D.J. (2007) Soluble A $\beta$  inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway. *J Biol Chem*. 282, 33305-33312.

Trejo J.L., Pons, S. (2001) Phosphatidylinositol-3-OH kinase regulatory subunits are differentially expressed during development of the rat cerebellum. *J Neurobiol*. 47, 39-50.

Tremblay F., Gagnon A., Veilleux A., Sorisky A., Marette A. (2005) Activation of the Mammalian Target of Rapamycin Pathway Acutely Inhibits Insulin Signaling to Akt and Glucose Transport in 3T3-L1 and Human Adipocytes. *Endocrinology*. 146, 1328-1337.

Umegaki H. (2010) Pathophysiology of cognitive dysfunction in older people with type 2 diabetes: vascular changes or neurodegeneration? *Age Ageing*. 39, 8-10.

Vassar R., Bennett B.D., Babu-Khan S., Kahn S., Mendiaz E.A., Denis P., Teplow D.B., Ross S., Amarante P., Loeloff R., Luo Y., Fisher S., Fuller J., Edenson S., Lile J., Jarosinski M.A., Biere A.L., Curran E., Burgess T., Louis J.C., Collins F., Treanor J., Rogers G., Citron M. (1999)  $\beta$ -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*. 286, 735-741.

Walsh D.M., Selkoe D.J. (2004) Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron*. 44, 181-193.

Wang Q., Liu L., Pei L., Ju W., Ahmadian G., Lu J., Wang Y., Liu F., Wang Y.T. (2003) Control of synaptic strength, a novel function of Akt. *Neuron*. 38, 915-928.

Watson G., Craft S. (2004) Modulation of memory by insulin and glucose: neuropsychological observations in Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol*. 490, 97-113.

Wei Y., Williams J.M., Dipace C., Sung U., Javitch J.A., Galli A., Saunders C. (2007) Dopamine transporter activity mediates amphetamine-induced inhibition of Akt through a  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase II-dependent mechanism. *Mol Pharmacol.* 71, 835-842.

Xie L., Helmerhorst E., Taddei K., Plewright B., Van Bronswijk W., Martins R. (2002) Alzheimer's  $\beta$ -amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. *Neurosci.* 22, 1-5.

Yano S., Morioka M., Kuratsu J., Fukunaga K. (2005) Functional proteins involved in regulation of intracellular  $Ca(2+)$  for drug development: role of calcium/calmodulin-dependent protein kinases in ischemic neuronal death. *J Pharmacol Sci.* 97, 351-354.

Zhao L. y Vogt P. (2008) Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene.* 27, 5486-5496.

Zhao W., Chen H., Xu H., Moore E., Meiri N. Quon M.J. Alkon D.L. (1999) Brain insulin receptors and spatial memory. *J Biol Chem.* 274, 34893-34902.

Zhao W.Q., De Felice F.G., Fernandez S., Chen H., Lambert M.P., Quon M.J., Krafft G.A., Klein W.L. (2008) Amyloid  $\beta$  oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. *FASEB J.* 22, 246-260.



Zhao W.Q., Santini F., Breese R., Ross D., Zhang X.D., Stone D.J., Ferrer M., Townsend M., Wolfe A.L., Seager M.A., Kinney G.G., Shughrue P.J., Ray W.J. (2010) Inhibition of calcineurin-mediated endocytosis and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors prevents amyloid  $\beta$  oligomer-induced synaptic disruption. *J Biol Chem.* 285, 7619-7632.

1. Heras-Sandoval D., Ferrera P. Arias C. (2012) Amyloid- $\beta$  Protein Modulates Insulin Signaling in Presynaptic Terminals. *Neurochem Res.* 37(9):1879-85.

Neurochem Res  
DOI 10.1007/s11064-012-0800-7

ORIGINAL PAPER

## Amyloid- $\beta$ Protein Modulates Insulin Signaling in Presynaptic Terminals

David Heras-Sandoval · Patricia Ferrera ·  
Clorinda Arias

Received: 25 January 2012 / Revised: 26 April 2012 / Accepted: 7 May 2012  
© Springer Science+Business Media, LLC 2012

**Abstract** Synaptic loss is a major neuropathological correlate of memory decline as a result of Alzheimer's disease (AD). This phenomenon appears to be aggravated by soluble amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) oligomers causing presynaptic terminals to be particularly vulnerable to damage. Furthermore, insulin is known to participate in synaptic plasticity through the activation of the insulin receptor (IR) and the PI3K signaling pathway, while low concentrations of soluble  $A\beta$  and  $A\beta$  oligomers aberrantly modulate IR function in cultured neurons. To further examine how  $A\beta$  and insulin interact in the pathology of AD, the present work analyzes the effect of insulin and  $A\beta$  in the activation of the IR/PI3K pathway in synaptosomes. We found that insulin increased mitochondrial activity and IR/Akt phosphorylation in synaptosomes taken from both hippocampus and cortex. Also, pretreatment with  $A\beta$  antagonized insulin's effect on hippocampal synaptosomes, but not vice versa. These results show that  $A\beta$  can reduce responsiveness to insulin. Combined with evidence that insulin desensitization can increase the risk of developing AD, our results suggest that the initial mechanism that impairs synaptic maintenance in AD might start with  $A\beta$  changes in insulin sensitivity.

**Keywords** Insulin resistance · Synaptosomes · Amyloid- $\beta$  · Mitochondrial function · IRS-1

### Introduction

It is widely accepted that synaptic loss is the major neuropathological correlate of memory decline during early stages of Alzheimer disease (AD) and precedes the appearance of amyloid plaques and neurofibrillary tangles [1–6]. Recent evidence also suggests that presynaptic alterations may play a primary role in AD pathophysiology [7]. This AD related synapse failure appears to be due to the toxic effects of small, soluble amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) oligomers [8–10]. Furthermore, it has been found that neuronal  $A\beta$  accumulation produces age-dependent depletion of presynaptic mitochondria [11] and induces changes in the content of vesicles in synaptosomes [12] suggesting that presynaptic terminals are especially at risk of  $A\beta$  toxicity. However, at present the molecular mechanisms involved in  $A\beta$ -induced impairment of presynaptic function are not completely understood.

Activity-dependent modification of synaptic strength underlies cognitive functions such as learning and memory. Furthermore, emerging data indicate that insulin may participate in synaptic plasticity through the activation of the insulin receptor (IR) and PI3K signaling. Specifically, the IR is known to be expressed in discrete regions of the brain, such as the hippocampus, an area known to be affected by AD [13]. Furthermore, that the IR and its mRNA are largely localized in synaptic terminals where they regulate neurotransmitter release and receptor recruitment [14, 15] supports its role in synaptic plasticity.

In AD, memory alterations have been linked to abnormalities in circulating insulin levels and/or defects in insulin signaling pathways [16–18]. Consistent with this, insulin has proved to be useful in improving cognitive function in those patients [19–21]. Insulin receptor signaling is compromised in AD neurons and it has been

D. Heras-Sandoval · P. Ferrera · C. Arias (✉)  
Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental,  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional  
Autónoma de México, Mexico D.F., Mexico  
e-mail: carias@servidor.unam.mx

suggested that neurons that degenerate in AD may be resistant to insulin-IGF-1/IR signaling [22]. In accordance with the insulin resistance hypothesis, it has been observed that insulin levels are altered and that IR kinase activity is diminished in postmortem AD brains [23]. Along with the evidence mentioned above, epidemiological studies have found that diabetes mellitus type 2 (DMT2) and insulin resistance can double the risk of developing AD [24, 25]. Also, low concentrations of soluble A $\beta$  [26] and A $\beta$  oligomers [27] aberrantly modulate IR function in cultured neurons. However very little is known about the functional significance of IR at presynaptic terminals and the possible involvement of A $\beta$  in modulating presynaptic insulin signaling, which might be a contributor factor in A $\beta$ -mediated insulin resistance and synaptic damage. Thus, the aim of the present work was to analyze the effect of insulin in the activation of the IR/PI3K pathway in the presence of A $\beta$  in hippocampal and cortical synaptosomes.

## Materials and Methods

### Synaptosomal Preparation

Male Wistar rats (220–250 g;  $n = 35$ ) bred in-house were used throughout the study and were handled according to the National Institute of Health Guide for the Care and use of Laboratory Animals (NIH Publications no. 80-23) and the Local Care Committee approved all animal treatments. Animals were killed by decapitation, the brain was manually dissected, and a purified synaptosomal fraction was obtained by the procedure described by Löscher et al. [28], slightly modified [12]. In brief, neocortex and hippocampus from both hemispheres were dissected on ice, homogenized in a solution containing 0.32 M sucrose and 5 mM Hepes, pH 7.0, and then centrifuged at 1,000 $\times g$  for 10 min at 4 °C. The supernatant was layered onto 1 ml of 1.2 M sucrose and centrifuged at 32,500 $\times g$  4 °C for 30 min. The gradient interphase was then carefully collected and diluted with 0.32 M sucrose to a final volume of 2 ml. The diluted suspension was then layered onto 1 ml 0.8 M sucrose and centrifuged for 30 min at 32,500 $\times g$ . This yielded a synaptosomal pellet, which was then suspended in 2 ml of Locke's solution, containing (in mM): 154 NaCl, 5.6 KCl, 2.3 CaCl<sub>2</sub>, 1.0 MgCl<sub>2</sub>, 3.6 NaHCO<sub>3</sub>, 5.0 glucose, and 5.0 Hepes, pH 7.2. Then, 200  $\mu$ l aliquots containing 50  $\mu$ g synaptosomal protein were incubated for 10, 15, or 60 min at 37 °C with 10, 100, or 1,000 nM insulin (Calbiochem) in the presence or absence of A $\beta$  protein fragment 25–35 (25  $\mu$ M; Sigma Chemicals). An additional set of aliquots was incubated with 25  $\mu$ M A $\beta$  protein fragment 25–35 for 10 min prior to a 10 min incubation with 100 nM insulin, as another incubated with insulin for 10 min prior to A $\beta$  treatment.

### Evaluation of Mitochondrial Function in Synaptosomes

Mitochondrial redox activity was examined through the conversion of MTT tetrazolium salt to formazan crystals by mitochondrial respiratory chain reactions as previously described [29]. Briefly, MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was dissolved in PBS at a concentration of 5 mg/ml, added to synaptosomes (final concentration = 0.5 mg/ml), and then allowed to incubate for an additional 15 min or 1 h, as appropriate. The synaptosomes were then centrifuged at 1,500 $\times g$  for 5 min and the pellet was solubilized with 2-isopropanol acid (0.5 ml). The absorbance of each sample was quantified at 570 nm using a spectrophotometer.

### Western Blotting

Activation of different substrates after insulin stimulation was evaluated by Western blotting using 30  $\mu$ g of synaptosomal fraction in 10 % SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane. Then, membranes were washed twice with PBS, blocked with solution containing PBS/5 % non-fat dry milk overnight at 4 °C, and then incubated with antibodies raised against insulin receptor substrate1-pY612 (1:1,000) (Invitrogen) and Akt-pS473 (1:1,000) (Cell Signaling Technology) overnight at 4 °C. After three washes with PBS containing 0.1 % Tween 20 for 5 min each, membranes were incubated with either goat anti-mouse or goat anti-rabbit horseradish peroxidase coupled secondary antibodies (1:15,000) (Santa Cruz, Biotechnology, Inc.) for 1 h at room temperature and then detected using a chemiluminescence ECL kit from Amersham, Arlington Heights, IL, USA) on Kodak X-Omat films. Monoclonal antibodies raised against  $\beta$ -actin (1:1,000 clone AC-74, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were used as an internal loading control.

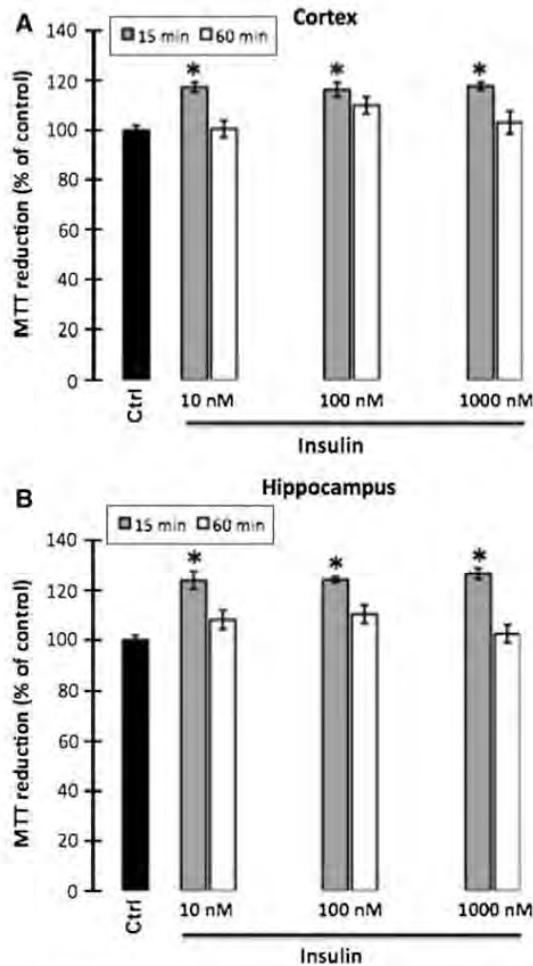
### Statistics

All data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance was calculated using Student's *t* test from 3 to 8 independent determinations in duplicate.

## Results

### Insulin and A $\beta$ Effects on Mitochondrial Redox Activity

To determine the effects of insulin on mitochondrial activity we incubated cortical and hippocampal synaptosomes for 15 or 60 min with insulin at relevant physiological concentrations (10, 100, or 1,000 nM). At all doses and in both brain regions, insulin induced a significant

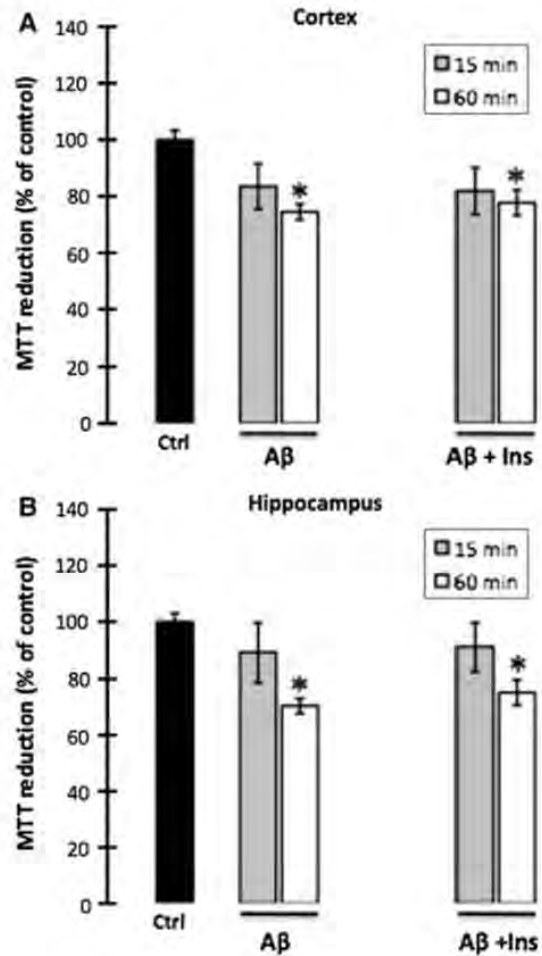


**Fig. 1** Insulin effect on mitochondrial metabolic function as measured by MTT reduction in cortical (a) and hippocampal (b) synaptosomes at 15 and 60 min. Mean  $\pm$  SEM from 4 to 6 independent experiments in duplicate. Student's *t* test, \* $P < 0.05$  versus control

( $P < 0.05$ ) 20 % increase of MTT reduction for at least 15 min, while no effect was achieved after 60 min of insulin exposure (Fig. 1a, b). Incubation with A $\beta$  alone reduced mitochondrial redox activity in cortical and hippocampal synaptosomes after 60 min (25 and 30 % respectively;  $P < 0.05$ ; Fig. 2), and prevented the insulin-induced activation of mitochondrial activity at 10 nM concentration ( $P < 0.05$ ; Fig. 2a, b).

#### Insulin Activates PI3K/Akt Pathway in Presynaptic Terminals

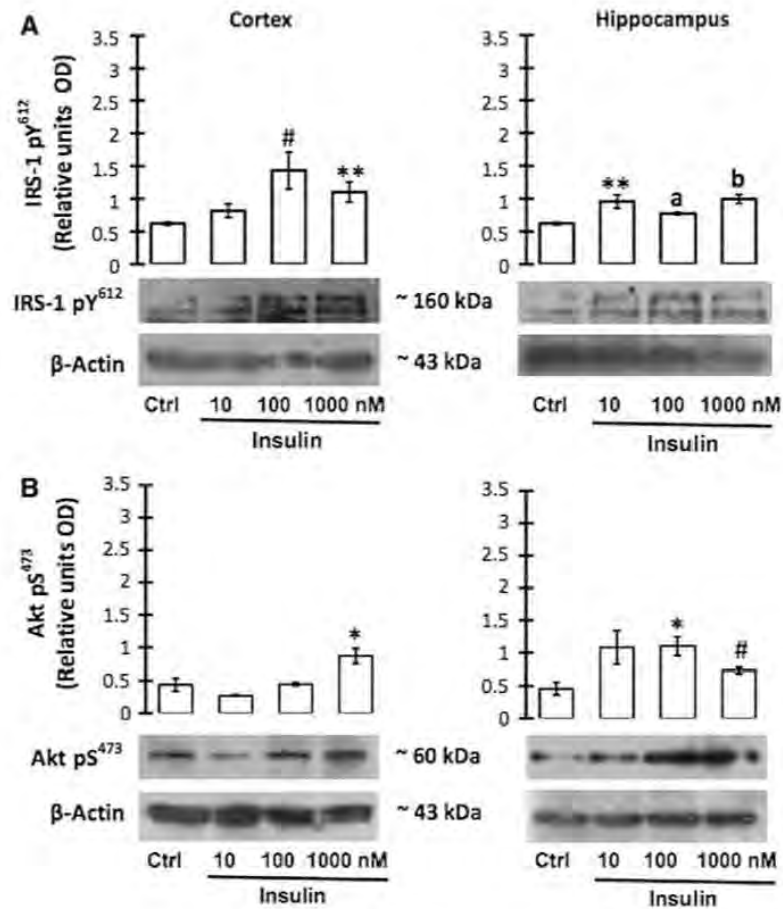
As insulin mediated activation of the PI3K/Akt pathway has not been previously studied at the presynaptic terminal,



**Fig. 2** Effect of A $\beta$  and A $\beta$  plus insulin on mitochondrial activity as measured by MTT reduction as a % of control in cortical and hippocampal synaptosomes at 15 and 60 min. The presence of insulin 10 (nM) did not change the inhibitory effect of A $\beta$  (25  $\mu$ M) on MTT reduction. Mean  $\pm$  SEM from 4 to 6 independent experiments in duplicate. Student's *t* test, \* $P < 0.05$  versus control (without treatment, dotted line). a Cortex and b hippocampus

we analyzed whether insulin induces phosphorylation of the IRS-1 at Tyr612 (tyrosine 608 in rat), the binding site of the p85 PI3K subunit [30, 31]. We also studied whether insulin induces phosphorylation of Akt at Ser473, one of the residues required to fully activate Akt in presence of insulin [32]. We found a significant ( $P < 0.05$ ) dose dependant effect of insulin on the phosphorylation of IRS-1 and Akt after 10 min of exposure to insulin (Fig. 3a, b). In hippocampal synaptosomes a significant increase in phosphorylation of IRS-1 and Akt was achieved at insulin

**Fig. 3** Effect of insulin on IRS1/Tyr612 (a) and Akt/Ser473 (b) phosphorylation in cortical and hippocampal synaptosomes. Representative western blot and densitometric analysis. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM from four independent experiments in duplicate. Student's *t* test compared to control, \* $P < 0.03$ ; \*\* $P < 0.04$ ; # $P < 0.05$ ; <sup>a</sup> $P < 0.003$ ; <sup>b</sup> $P < 0.007$



concentrations as low as 10 nM ( $P < 0.05$ ), an effect found in cortical synaptosomes only when the concentration was increased to 100 nM ( $P < 0.05$ ).

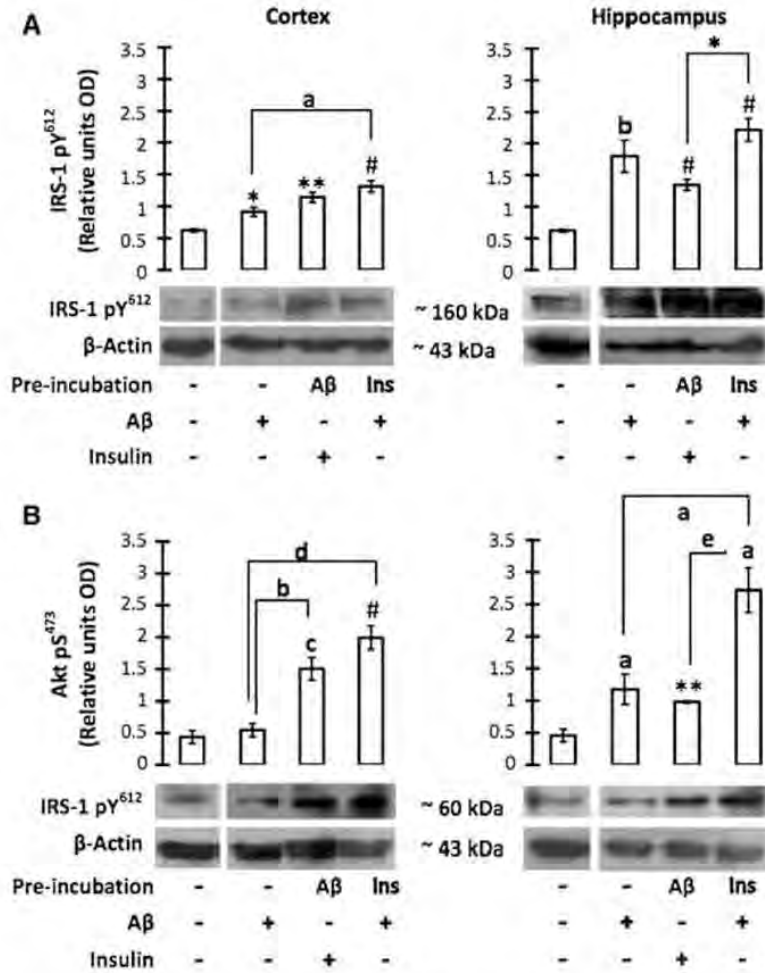
#### A $\beta$ Effects on IRS-1 and Akt Activation

To explore if A $\beta$  was able to modulate insulin/PI3K signaling we measured IRS-1 and Akt activation in presence of A $\beta$ 25–35 for 10 min (Fig. 4). As shown, A $\beta$  induced a significant increase of IRS-1 phosphorylation in both cortical and hippocampal synaptosomes ( $P < 0.02$ ; Fig. 4a). However the phosphorylation of Akt/Ser473 reached significance only in hippocampal synaptosomes ( $P < 0.03$ ; Fig. 4b). This result suggests that insulin/PI3K pathway may be activated by A $\beta$  and also suggests that A $\beta$  might be involved in increasing the sensitivity of insulin-mediated PI3K activation, particularly in the hippocampus.

#### Evaluation of IRS-1 and Akt Activation in Synaptosomes Pretreated with Insulin or A $\beta$

To further evaluate the effects of A $\beta$  on insulin signaling, cortical and hippocampal synaptosomes were incubated for 10 min with A $\beta$  25  $\mu$ M and then exposed to insulin 100 nM for 10 min (Fig. 4). Under these experimental conditions, insulin produced a significant increase in IRS-1 ( $P < 0.05$ ; Fig. 4a) and Akt phosphorylation ( $P < 0.05$ ; Fig. 4b) over the effects produced solely by A $\beta$  in cortical synaptosomes. However, no further increase in A $\beta$  induced IRS-1 and Akt activation was produced by insulin pretreatment in hippocampal synaptosomes, suggesting that insulin may not be able to further activate the IRS-1 and Akt in this fraction when IR is previously occupied by A $\beta$ . In agreement with this interpretation, when cortical and hippocampal synaptosomes were previously incubated with insulin, a significant twofold to threefold increase of IRS-1 and Akt

**Fig. 4** Insulin and A $\beta$  effect on Tyr612/IRS1 (a) and Ser473/Akt (b) phosphorylation. Cortical and hippocampal synaptosomes were pre-incubated 10 min either with insulin (100 nM) or A $\beta$  (25  $\mu$ M) and then exposed by 10 additional min to A $\beta$  or insulin. Representative western blot and densitometric analysis. Mean  $\pm$  SEM from three independent experiments. Student's *t* test, \**P* < 0.02; \*\**P* < 0.004; #*P* < 0.002; <sup>a</sup>*P* < 0.03; <sup>b</sup>*P* < 0.01; <sup>c</sup>*P* < 0.007; <sup>d</sup>*P* < 0.003; <sup>e</sup>*P* < 0.04. *Ins* insulin, A $\beta$  amyloid- $\beta$



phosphorylation was observed after A $\beta$  exposure (*P* < 0.05), suggesting that insulin-mediated activation of IRS-1 and Akt is potentiated in the presence of A $\beta$  (Fig. 4a, b compared with Fig. 3a, b).

**Discussion**

Our results demonstrate that presynaptic nerve endings are activated by insulin and that A $\beta$  modulates the insulin-dependent activation of IRS-1 and Akt. We reported a transient, positive effect of insulin on mitochondrial activity as measured by an increase in dehydrogenases reactions that reached the maximum effect at low (10 nM) insulin concentrations during the first 15 min of exposure. Although the main insulin sensitive glucose transporter GLUT4 is not highly expressed in neurons [33], which

excludes the possibility of a direct effect of insulin in glucose uptake, the observed improvement in mitochondrial function suggests a positive effect of insulin in the control of energy homeostasis in synaptosomes. In addition, Huang et al. [34] have reported that 1 nM insulin increases mitochondrial inner membrane potential, which correlates with an increase in ATP production, glycolytic flux, and mitochondrial redox potential in cultured neurons. Moreover, some evidence suggests that neuronal insulin promotes PI3K/Akt dependant glycolytic activity [35, 36]. Interestingly, the insulin enhancing effect on synaptosomal metabolic activity was totally blocked by A $\beta$  when synaptosomes were exposed previously to this AD-related peptide.

Insulin exerts its effects after binding to its receptor promoting the phosphorylation of IRS-1, which in turn induces activation of PI3K and phosphorylation of Akt.

Here we found that in cortical and hippocampal synaptosomes insulin promotes dose-dependent phosphorylation of the IRS-1 as well as serine 473 of Akt, a phospho-residue required for maximal activity of downstream effectors of the PI3K/mTORC2 complex [37].

Previous evidence has implicated A $\beta$  in modification of insulin signaling possibly by interacting with the IR [27, 38], thereby leading to changes in synaptic plasticity and neuronal survival. More recently it was found that intra neuronal A $\beta$  might also interfere between Pdk1 and Akt interactions, thereby preventing Akt activation [39]. Here we found that short exposure to A $\beta$  induces an increase in the phosphorylation of the IRS-1 in both cortical and hippocampal synaptosomes, but that this effect on IRS-1 phosphorylation only leads to significant Akt activation in hippocampal synaptosomes. As A $\beta$  is found at IR sites in synapses, these results suggest a novel effect of A $\beta$ -dependent modulation of synaptic functions, particularly in the hippocampus, which has a higher density of insulin receptors [14]. It is of interest to note that the effects of A $\beta$  on the activation of Akt, at a residue associated with the development of insulin resistance, could represent a mechanistic link with this metabolic condition and some pathophysiological aspects of AD at presynaptic level. In addition, increased levels of phospho-Ser473Akt have been found in AD brains [40], supporting the relationship between A $\beta$  and modification in the PI3K/Akt pathway.

We also analyzed two conditions where the IR was previously occupied by A $\beta$  or insulin and then exposed with the other of the two compounds. We found it particularly remarkable that both IRS-1 and Akt phosphorylation were increased when insulin was added before A $\beta$ , particularly in hippocampal synaptosomes. However, when synaptosomes were previously exposed to A $\beta$ , insulin effects were reduced. These results suggest that negative modulation of insulin activity probably depends on the A $\beta$  binding to IR and its consequent redistribution, as has been previously suggested [27].

Although the full range of consequences of A $\beta$  modulation on insulin actions at presynaptic terminals remain to be determined, it appears that A $\beta$  induces a reduced responsiveness to insulin. When combined with the fact that insulin desensitization can increase the risk of developing AD suggests that the initial mechanism that impairs synaptic maintenance might start with changes in insulin sensitivity as insulin receptors in the brain are desensitized early on in the development of AD [18].

**Acknowledgments** This work was supported by grants from CONACYT and PAPIIT, UNAM. David Heras-Sandoval is supported by CONACYT 217779 and is currently in the PhD program: Doctorado en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

## References

- DeKosky ST, Scheff SW (1990) Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol* 27:457–464
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30:572–580
- DeKosky ST, Scheff SW, Styren SD (1996) Structural correlates of cognition in dementia: quantification and assessment of synapse change. *Neurodegeneration* 5:417–421 (review)
- Gomez-Isla T, West HL, Rebeck GW, Harr SD, Growdon JH, Locascio JJ, Perls TT, Lipsitz LA, Hyman BT (1996) Clinical and pathological correlates of apolipoprotein E epsilon 4 in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 39:62–70
- Masliah E (2001) Recent advances in the understanding of the role of synaptic proteins in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *J Alzheimer's Dis* 3:121–129
- Coleman PD, Yao PJ (2003) Synaptic slaughter in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 24:1023–1027
- Shen J (2010) Impaired neurotransmitter release in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neurodegener Dis* 7:80–83
- Klein WL, Krafft GA, Finch CE (2001) Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci* 24:219–224 (review)
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353–356
- Hsieh H, Boehm J, Sato C, Iwatsubo T, Tomita T, Sisodia S, Malinow R (2006) AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* 52:831–843
- Zhao XL, Wang WA, Tan JX, Huang JK, Zhang X, Zhang BZ, Wang YH, Yang Cheng HY, Zhu HL, Sun XJ, Huang FD (2010) Expression of beta-amyloid induced age-dependent presynaptic and axonal changes in *Drosophila*. *J Neurosci* 30:1512–1522
- Mungarro-Menchaca X, Ferrera P, Morán J, Arias C (2002) Beta-amyloid peptide induces ultrastructural changes in synaptosomes and potentiates mitochondrial dysfunction in the presence of ryanodine. *J Neurosci Res* 68:89–96
- Unger J, McNeill TH, Moxley RT 3rd, White M, Moss A, Livingston JN (1989) Distribution of insulin receptor-like immunoreactivity in the rat forebrain. *Neuroscience* 31:143–157
- Abbott MA, Wells DG, Fallon JR (1999) The insulin receptor tyrosine kinase substrate p58/53 and the insulin receptor are components of CNS synapses. *J Neurosci* 19:7300–7308
- Zhao W, Chen H, Xu H, Moore E, Meiri N, Quon MJ, Alkon DL (1999) Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *J Biol Chem* 274:34893–34902
- Luchsinger JA, Mayeux R (2004) Cardiovascular risk factors and Alzheimer's disease. *Curr Atheroscler Rep* 6:261–266
- Rivera EJ, Goldin A, Fulmer N, Tavares R, Wands JR, de la Monte SM (2005) Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. *J Alzheimer's Dis* 8:247–268
- Craft S (2007) Insulin resistance and Alzheimer's disease pathogenesis: potential mechanisms and implications for treatment. *Curr Alzheimer Res* 4:147–152 (review)
- Craft S, Asthana S, Newcomer JW, Wilkinson CW, Matos IT, Baker LD, Cherrier M, Lofgreen C, Latendresse S, Petrova A, Plymate S, Raskind M, Grimwood K, Veith RC (1999) Enhancement of memory in Alzheimer disease with insulin and

- somatostatin, but not glucose. *Arch Gen Psychiatry* 56: 1135–1140
20. Kern W, Peters A, Fruehwald-Schultes B, Deininger E, Born J, Fehm HL (2001) Improving influence of insulin on cognitive functions in humans. *Neuroendocrinology* 74:270–280
  21. Reger MA, Watson GS, Green PS, Baker LD, Cholerton B, Fishel MA, Plymate SR, Cherrier MM, Schellenberg GD, Frey WH II, Craft S (2008) Intranasal insulin administration dose-dependently modulates verbal memory and plasma amyloid-beta in memory-impaired older adults. *J Alzheimer's Dis* 13:323–331
  22. Moloney AM, Griffin RJ, Timmons S, O'Connor R, Ravid R, O'Neill C (2010) Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signaling. *Neurobiol Aging* 31:224–243
  23. Frölich L, Blum-Degen D, Bernstein H-G, Engelsberger S, Humrich J, Laufer S, Muschner D, Thalheimer A, Türk A, Hoyer S, Zöchling R, Boissl K, Jellinger K, Riederer P (1998) Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 105:423–438
  24. Biessels G (2002) Ageing and diabetes: implications for brain function. *Eur J Pharmacol* 441:1–14
  25. Janson J, Laedtke T, Parisi JE, O'Brien P, Petersen RC, Butler PC (2004) Increased risk of type 2 diabetes in Alzheimer disease. *Diabetes* 53:474–481
  26. Townsend M, Mehta T, Selkoe DJ (2007) Soluble A $\beta$  inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway. *J Biol Chem* 282:33305–33312
  27. Zhao WQ, De Felice FG, Fernandez S, Chen H, Lambert MP, Quon MJ, Krafft GA, Klein WL (2008) Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. *FASEB J* 22:246–260
  28. Löscher W, Böhme G, Müller F, Pagliusi S (1985) Improved method for isolating synaptosomes from 11 regions of one rat brain: electron microscopic and biochemical characterization and use in the study of drug effects on nerve terminal gamma-aminobutyric acid in vivo. *J Neurochem* 45:879–889
  29. Mossman T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods* 65:55–63
  30. Hers I, Bell CJ, Poole AW, Jiang D, Denton RM, Schaefer E, Tavaré JM (2002) Reciprocal feedback regulation of insulin receptor and insulin receptor substrate tyrosine phosphorylation by phosphoinositide 3-kinase in primary adipocytes. *Biochem J* 368:875–884
  31. Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF (2005) Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 87:99–109 (review)
  32. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 15:6541–6551
  33. Chiu SL, Chen CM, Cline HT (2008) Insulin receptor signaling regulates synapse number, dendritic plasticity, and circuit function in vivo. *Neuron* 58:708–719
  34. Huang TJ, Verkhratsky A, Fernyhough P (2005) Insulin enhances mitochondrial inner membrane potential and increases ATP levels through phosphoinositide 3-kinase in adult sensory neurons. *Mol Cell Neurosci* 28:42–54
  35. Benomar Y, Naour N, Aubourg A, Bailleux V, Gertler A, Djiane J, Guerre-Millo M, Taouis M (2006) Insulin and leptin induce Glut4 plasma membrane translocation and glucose uptake in a human neuronal cell line by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Endocrinology* 147:2550–2556
  36. Cheng CM, Reinhardt RR, Lee WH, Joncas G, Patel SC, Bondy CA (2000) Insulin-like growth factor I regulates developing brain glucose metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10236–10241
  37. Pearce LR, Komander D, Alessi DR (2010) The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:9–22 (review)
  38. Xie L, Helmerhorst E, Taddei K, Plewright B, Van Bronswijk W, Martins R (2002) Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. *J Neurosci* 22:RC221
  39. Lee HK, Kumar P, Fu Q, Rosen KM, Querfurth HW (2009) The insulin/Akt signaling pathway is targeted by intracellular beta-amyloid. *Mol Biol Cell* 20:1533–1544
  40. Griffin RJ, Moloney A, Kelliher M, Johnston JA, Ravid R, Dockery P, O'Connor R, O'Neill C (2005) Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology. *J Neurochem* 93:105–117



2. Heras-Sandoval D., Avila-Muñoz E., Arias C. (2011) Review: The Phosphatidylinositol 3-Kinase/mTOR Pathway as a Therapeutic Target for Brain Aging and Neurodegeneration. *Pharmaceuticals*. 4(8), 1070-1087.

*Pharmaceuticals* 2011, 4, 1070-1087; doi:10.3390/ph4081070

OPEN ACCESS

*pharmaceuticals*

ISSN 1424-8247

www.mdpi.com/journal/pharmaceuticals

Review

## The Phosphatidylinositol 3-Kinase/mTor Pathway as a Therapeutic Target for Brain Aging and Neurodegeneration

David Heras-Sandoval, Evangelina Avila-Muñoz and Clorinda Arias \*

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México D.F., Mexico;  
E-Mails: david.herassandoval@gmail.com (D.H.-S.); ediacaraart@yahoo.com.mx (E.A.-M.)

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: carias@unam.mx;  
Tel.: +52-55-56229215; Fax: +52-55-56229182.

Received: 12 May 2011; in revised form: 22 July 2011 / Accepted: 28 July 2011 /  
Published: 4 August 2011

---

**Abstract:** Many pathological conditions are associated with phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) dysfunction, providing an incentive for the study of the effects of PI3K modulation in different aspects of diabetes, cancer, and aging. The PI3K/AKT/mTOR pathway is a key transducer of brain metabolic and mitogenic signals involved in neuronal proliferation, differentiation, and survival. In several models of neurodegenerative diseases associated with aging, the PI3K/AKT pathway has been found to be dysregulated, suggesting that two or more initiating events may trigger disease formation in an age-related manner. The search for chemical compounds able to modulate the activity of the PI3K/AKT/mTOR pathway is emerging as a potential therapeutic strategy for the treatment and/or prevention of some metabolic defects associated with brain aging. In the current review, we summarize some of the critical actions of PI3K in brain function as well as the evidence of its involvement in aging and Alzheimer's disease.

**Keywords:** PI3K; mTOR; insulin resistance; brain aging; Alzheimer's disease

---

### 1. Introduction

The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT serine/threonine protein kinase (AKT)/mammalian target of rapamycin kinase (mTOR) signaling pathway in central nervous system (CNS) has been implicated in metabolism regulation and energy homeostasis [1] and has emerged as an important

mediator of neuronal physiology, appearing to serve as a direct link between aspects of learning and memory, neuronal survival, neurogenesis and apoptosis [2,3]. The PI3K is highly conserved through evolution, and has been described in species ranging from insects to mammals [3]. PI3K signaling has been implicated in aging and lifespan regulation, and the proliferation of adult neuronal progenitor cells, as well as in synaptic plasticity, which gives PI3K relevance to cognitive processes in addition to pathological brain aging and neurodegeneration [1-8]. The ability of PI3K to control key functions of the cell provides the incentive for investigations into the effects of the modulation of PI3K signaling pathways in different aspects of neuronal physiology, including its role in neuronal development as well as brain aging and dysfunction.

The PI3Ks are multifaceted enzymes that are primarily responsible for the production of 3' phosphoinositides from phosphatidylinositol in response to growth factors. The most common PI3K is PI3K IA, a functional heterodimer comprised of two subunits, one catalytic and one regulatory, with molecular weights of 110 kD (p110) and 85 kD (p85), respectively [4,9,10]. Three different genes (p85 $\alpha$ , p85 $\beta$ , and p55 $\gamma$ ) encode the regulatory unit. In addition, the p85 $\alpha$  mRNA can undergo alternative splicing to produce p50 $\alpha$  and p50 $\alpha$ /AS53. The p110 protein exists as one of four isoforms ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) [1].

Most neurons express all the isoforms of the regulatory p85 subunit, but relatively high levels of the catalytic p110 $\alpha$  are found in the hippocampus, olfactory bulb, and cerebellum [2,11]. The various isoforms can result in different roles for PI3K in cellular physiology depending upon the sub-cellular location, the metabolic cellular context, and the involvement of upstream signals and receptor signaling pathways [3].

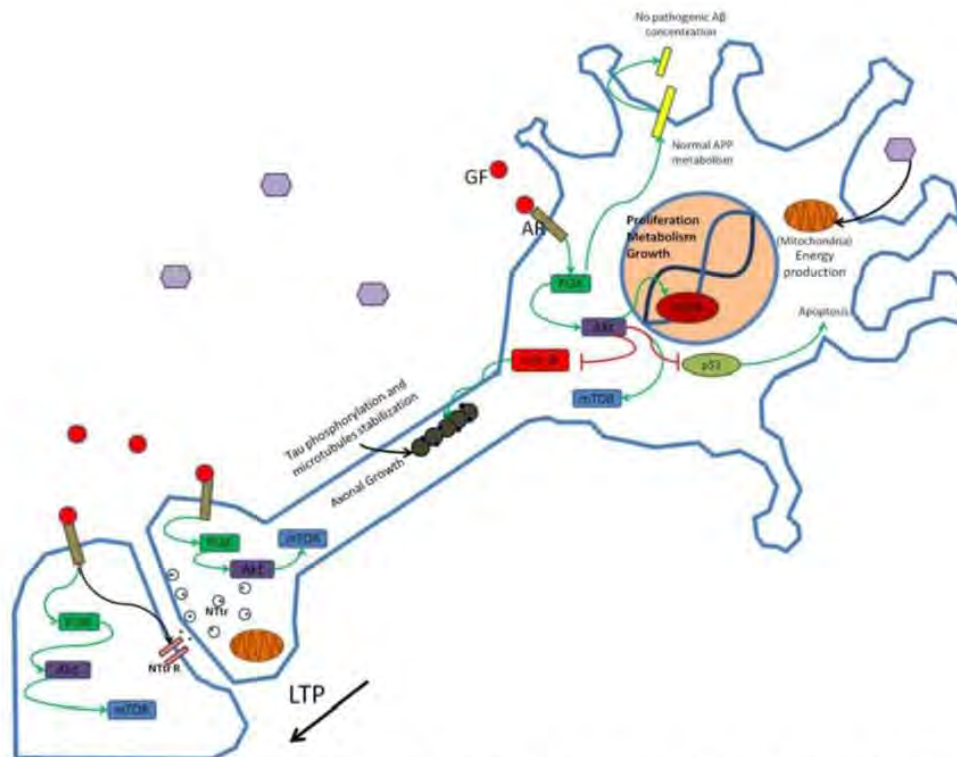
## 2. The PI3K/AKT Pathway in Neuronal Plasticity

The PI3K/AKT pathway is a key transducer of mitogenic and metabolic signals that drive proliferation and inhibit both the apoptosis and differentiation of adult neuronal progenitors [12]. Activation of PI3K is induced by many growth factors such as insulin and insulin like growth factor 1 (IGF1), Ras proteins, or the diminished activity of the phosphatase and tensin homolog (PTEN). The activation of the catalytic subunit of PI3K leads to the phosphorylation of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) to generate phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP3). In turn, PIP3 drives the activation of the phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK-1). The serine-threonine kinase, AKT, is recruited to the cell membrane and phosphorylated by PDK-1, which stimulates the catalytic activity of AKT, which in turn phosphorylates and downregulates glycogen synthase kinase 3  $\beta$  (GSK3 $\beta$ ). Once activated, AKT is able to phosphorylate numerous downstream signaling proteins, including members of the Bad-dependent apoptosis machinery, the forkhead transcription factor proteins (FOXOs), the nuclear factor  $\kappa$ B transcription factor (NF $\kappa$ B) and GSK3 $\beta$ , as well as mTOR, which modulates protein translation machinery [12]. In addition, signaling proteins that contain pleckstrin homology (PH) domains accumulate at sites of PI3K activation in the inner surface of the plasma membrane *via* an interaction between the PH domains and the phospholipid products of PI3K [4,5,12].

During brain development, PI3K is involved in a variety of cellular functions that include proliferation, cell migration, and axon guidance [13]. In addition, PI3K activity is essential for microtubule transport during axonal growth cone formation and for the establishment of neuronal

polarity [16]. Signaling of PI3K/AKT *via* the cAMP response element-binding (CREB) transcription factor is involved in the proliferation of hippocampal neuronal cells following fibroblast growth factor 2 (FGF2) stimulus and activation of the FGF receptor 1 [12]. In adult brain, the activation of PI3K promotes the survival of newly-formed dentate gyrus granule cells generated during exercise, which lead to increase in synaptic plasticity [14].

**Figure 1.** PI3K signaling in normal neural function and LTP induction.



Growth factors (GF) such as insulin bind to appropriate receptors (AR) and activate the PI3K pathway modulating synaptic structure, function and neural transmission. Through phosphorylation of enzymes and enhanced gene transcription PI3K activation promotes neuronal growth and survival and participates in the establishment of long-term potentiation (LTP). Hexagons represent normal glucose levels and utilization for energy production. Schematic representation of non-pathogenic amyloid precursor protein (APP) metabolism and tau function in neurons is shown. NTr, neurotransmitter; NTrR, neurotransmitter receptor; p53, transcriptional regulatory protein 53.

The role of the PI3K/AKT signaling cascade in synaptic plasticity and memory processes in the mature brain deserves a special mention. In the adult brain, evidence has accumulated for a variety of mechanisms by which PI3K signaling modulates long-term potentiation (LTP), a cellular correlate of memory. Intra-cerebro-ventricular (i.c.v.) infusions of the PI3K inhibitor LY294002 blocked LTP maintenance in the *in vivo* hippocampus and were associated with a transient phosphorylation of the PI3K substrate AKT at Ser473 [15]. Additionally, *in vivo* infusion of the PI3K inhibitor wortmannin

together with LY294002 and the mTOR inhibitor rapamycin into the pre-frontal cortex also inhibited the long-term retention of trace fear memory [16]. PI3K may influence synaptic plasticity *via* the modulation of receptor trafficking to the synaptic membrane, a mechanism that promotes rapid and long lasting synaptic changes [17,18]. AKT is also involved in the control of synaptic strength, *via* phosphorylation of the GABA receptor. In this regard, it is possible that insulin stimulation induces a localized activation of PI3K at dendritic synapses, which in turn induces activation of AKT in the post-synaptic vicinity [19]. Interestingly, exposure to neurotrophin 3 (NT-3) or brain derived neurotrophic factor (BDNF) produces synapse maturation at the neuromuscular junction (NMJ) as well as dendritic sprouting in hippocampal neurons, and in both kinds of neurons, PI3K signaling promotes long-lasting changes in synaptic strength that depend upon both presynaptic and postsynaptic protein synthesis mediated *via* the activity of the eukaryotic translation initiation factor alpha (eIF2- $\alpha$ ), a target of mTOR [20,21] (Figure 1).

It has been suggested that signaling pathways that play a relevant role during development may also be implicated in aging [22]. Accordingly, mutations that inactivate certain signaling pathways, such as insulin/PI3K signaling, slow senescence and increases lifespan up to several folds in mouse models [23].

### 3. PI3K and Brain Aging

Brain aging is a highly complex process involving multiple systems and cellular pathways. Since more than a decade it is known that mutation in some elements of the insulin/PI3K pathway significantly impact longevity [7,24]. A constant feature of aging is the induction of stress response pathways controlled at the molecular level by a number of highly conserved molecules and transcriptional regulators, including proteins of the insulin and insulin like growth factor 1 (IGF1), mTOR, sirtuin system, and AMP activated protein kinase (AMPK) pathways [26-28].

The search for longevity-related genes has led to the increased understanding of signaling pathways involved in the regulation of lifespan in some model organisms. Among these, insulin/PI3K signaling has been demonstrated to be a key player in the control of longevity. Insulin, as well as insulin like growth factor 1 (IGF1), binds to the insulin receptor (IR). Adapter proteins, such as insulin receptor substrate proteins (IRS1-4), bind to tyrosine residues and, in turn, activate PI3K and AKT, which then act upon different target proteins such as GSK3 $\beta$  and mTOR [7,8].

Mutations in some genes that participate in PI3K signaling can lead to increased life span. In *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), mutations in Age-1, a PI3K catalytic subunit homologue, produce an elevated lifespan [29-31]. Another example is Daf-2, an IR homologue, a temperature-dependent mutation of which nearly doubles lifespan in *C. elegans*. Daf-2 produces stress resistance and longevity *via* the inhibition of the FOXO transcription factor homologue Daf-16. In addition, loss of the *Drosophila melanogaster* IRS homologue, CHICO, has shown to increase longevity [31].

In mammals, the role of the insulin/IGF1/PI3K pathway in longevity seems to be more complex. For example, in older humans, a compensatory hyperinsulinemia is developed to maintain glucose homeostasis and prevent type 2 diabetes mellitus (T2DM). Nevertheless, elevated levels of circulating insulin have negative effects on the brain and can diminish lifespan. It has been proposed, therefore, that attenuating insulin signaling in aged or in overweight people may halt the damaging effects of hyperinsulinemia [32]. In support of this idea, mice with IR mutations were found to have diminished

adipose tissue and increased longevity [33]. Interestingly, the selective mutation of brain IRS2 is sufficient for increased longevity in mice, suggesting that targeted inhibition of this protein may also impact longevity in humans [32]. Although the role of insulin signaling in human longevity is controversial, it has been shown that centenarian individuals show an increase in peripheral sensitivity to insulin and reduced levels of circulating insulin [34]. Findings from studies of nonagenarians likewise suggest that longevity may be associated with differences in insulin sensitivity [35]. Two external factors that impact aging are known to be physical exercise and caloric restriction; this last factor, in particular, appears to have important effects on longevity-related processes. Caloric restriction in mice reduces the intensity and duration of insulin secretion required for glucose homeostasis, leading to diminished insulin levels and promoting the expression of antioxidant enzymes [36].

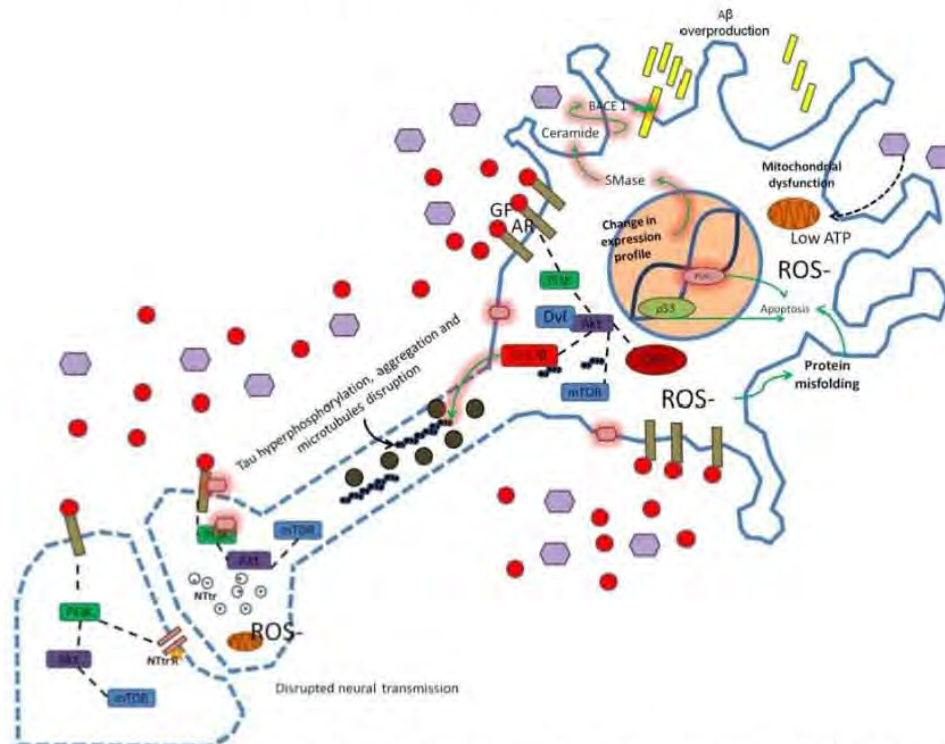
The mTOR kinase function, a downstream participant of the insulin/PI3K pathway, may be particularly important for longevity. Numerous cellular signals regulate mTOR activity; these include low oxygen pressure, reduced nutrient concentration, oxidative stress, and DNA damage. Once activated, mTOR participates in nutrient importation, translation of messenger RNA, and the biogenesis of ribosomes. mTOR activates the eukaryotic translation elongation factor 2 (eEF2), eEF2 kinase (eEF2K), ribosomal protein S6 kinase (S6K), which regulates protein synthesis and gene transcription [37,38]. Diminished activation of the PI3K/AKT/mTOR pathway significantly augments longevity in mice [39]. Likewise, centenarian individuals that show increased sensitivity to insulin also have decreased mTOR activity. Thus, longevity seems to be associated with the reduced activity of the insulin or IGF-mediated PI3K/AKT/mTOR pathways, implicating these signaling cascades as important targets for pharmacological manipulation [22]. Importantly, mTOR activates S6K, which in turn phosphorylates IRS proteins in serine residues, inhibiting insulin signaling, by a negative feedback loop of regulation [40]. The PI3K/mTOR pathway also plays an important role in autophagy, a catabolic process that helps to maintain cellular homeostasis. The regulation of autophagy is intimately associated with the control of cell growth, cell proliferation, cell survival, and cell death. Impairments of autophagy have also been demonstrated in neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD) [40,41].

Along PI3K/AKT/mTOR pathway the sirtuin system, found from bacteria to mammals, has shown to play an important role in controlling longevity, oxidative stress, insulin resistance, metabolism and neuroprotection. Sirtuins belongs to a family of class III histone deacetylases that transfers acetyl groups from lysine residues to ADP-ribose moiety of NAD<sup>+</sup> producing a deacetylated protein, nicotinamide and a 2'-O-acetyl-ADP-ribose. SIRT1 and SIRT2 are highly expressed in brain [27,42-44]. It has been probed that SIRT1 interacts directly with the p85 subunit of PI3K forming a complex that, after insulin stimulation, binds to IRS1/2 and activates this pathway. Moreover, SIRT1 levels correlate positively with AKT phosphorylation at serine 473. Other target proteins of SIRT1 are AMPK, acetyl CoA synthetase, glutamate dehydrogenase, IRS, histones, and other molecules involved in the modulation of energy metabolism, stress responses, and cell survival [27,42-45].

Biological processes linked to normal aging also include systemic inflammatory and immune responses, oxidative stress, and altered calcium regulation. Among these, oxidative stress leads to mitochondrial dysfunction resulting in reduced respiratory metabolism and the increased generation of reactive oxygen species (ROS). Also, accumulation of DNA damage may results from both increased oxidative damage and the reduced efficiency of DNA repair, predisposing the cell to apoptosis, senescence, and inflammation.

Aging is also associated with protein misfolding and subsequent aggregation in the cytoplasm, nucleus, and endoplasmic reticulum. Age-related cellular damage, as well as stress and physiological decline, contribute to the pathogenesis of age-related diseases including metabolic syndromes, inflammatory disorders, cancer, and neurodegenerative diseases [46-49] (Figure 2).

**Figure 2.** PI3K signaling in neural aging and disease.



Alterations in PI3K signaling due to oxidative stress, insulin resistance, hyperinsulinemia, hyperglycemia, high cholesterol or inflammation alter synaptic structure, function and neural transmission. Modification in the APP/A $\beta$  metabolism leads to A $\beta$  overproduction and dysregulation of GSK3 activity may induce tau hyperphosphorylation. Changes in cellular microenvironment leads to elevated ROS production, mitochondrial dysfunction, low ATP levels and increased neuronal damage (as indicated by dotted blue lines in axonal and synaptic regions of the neuron scheme). Star represents low neurotransmitter receptor levels, purple hexagons represent high glucose concentration, pink hexagons represent chemical modification of proteins/membrane (e.g., glycosylation), GF, growth factor; AR, appropriate receptor; Dvl, disheveled protein; SMase, sphingomyelinase.

### 3.1. Oxidative Stress and PI3K in Aging

ROS are produced at low levels during normal physiological conditions and are scavenged by endogenous antioxidant systems that include superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase, catalase, and vitamins E and C [50]. When the generation of ROS overrides the scavenging ability of

the endogenous antioxidant system, oxidative stress occurs in the cell. Several features of the brain suggest that it is highly sensitive to oxidative stress that, combined with preexisting impairments in metabolic status, leads to the damage and destruction of both neural and vascular cells. Aging is accompanied by a general increase in oxidative stress, perhaps due to decreased antioxidant defenses [51-53].

AKT is a critical survival factor that can modulate cellular pathways in both the central and peripheral nervous systems. Activation of AKT is an essential PI3K-dependent regulatory step in the cellular response to oxidative stress. Early studies have demonstrated that over-expression of AKT in neurons prevents apoptosis during growth factor withdrawal [54]. CNS expression of AKT1 and AKT2 are increased in the early stages of embryonic development, but decreases gradually in post-natal cells [49]. In the adult brain, the expression of AKT1 and AKT2 is weak; however, a dramatic increase in the expression of AKT1 mRNA and protein is induced when cells are subjected to injury [55-57]. AKT expression has shown to be necessary and sufficient for neuronal survival, as the expression of dominant-negative AKT, or the pharmacological inhibition of PI3K, causes neurons to undergo apoptosis even in the presence of neurotrophic factors [58] and induces cell death during oxidative stress [57,59]. Further studies have confirmed that endogenous cellular stores of AKT provide the cell protection from injury [56,57,59]. In diverse paradigms of neuroprotection, AKT phosphorylation mediates neuronal survival elicited by antioxidants [60]. Oxidative stress associated with high cholesterol intake impairs insulin signaling, increases serine phosphorylation of IRS1, and suppresses insulin-stimulated PI3K and AKT activities, leading to increased stress activated c-Jun N-terminal kinase (JNK) activity that underlies cognitive impairments in mice [61]. Reciprocally, the activity of mTOR may increase the mitochondrial production of ROS by activating mitochondrial respiratory capacity [62].

Thus, a proper balance between the transient and sustained activation of PI3K/AKT seems to be important for neuronal survival under diverse circumstances associated with cell injury and oxidative stress.

### 3.2. PI3K Signaling and Alzheimer's disease

AD is the most prevalent progressive neurological disease in the elderly population, affecting millions of individuals throughout the world. One of the two main pathological hallmarks of AD is the deposition of amyloid  $\beta$  protein ( $A\beta$ ) in the form of senile plaques throughout the hippocampus and neocortex [63]. The accumulation of  $A\beta$  appears to be influenced by many complex processes including multiple proteolytic events involved in  $A\beta$  production and defects in  $A\beta$  degradation and removal. Although the pathophysiology of AD is matter of intense study, a promising area of research concerns the elucidation of abnormal spatio-temporal integration of metabolic signals, particularly those downstream of PI3K/AKT/mTOR activity. Haugabook *et al.* demonstrated a significant reduction (40–50%) in  $A\beta$  accumulation in the Tg2576 transgenic mouse model of AD after oral administration of the PI3K inhibitor wortmannin. In addition, it was found that wortmannin may influence the trafficking of the amyloid precursor protein (APP) and/or its metabolites, resulting in a decreased secretion of the  $A\beta$  peptide [64]. In line with the above evidence, it has been found a bidirectional modulation of the APP metabolism by insulin in neuroblastoma cells: increasing the release of soluble APP [65], reducing

intracellular levels of A $\beta$ 40/42 and increasing A $\beta$ 40/42 secretion [66]. Additional evidence shows that PI3K mediates a switch in the expression of neurotrophin receptors, from the high affinity catalytic neurotrophin receptor that binds specifically nerve growth factor, TrkA, to the low affinity neurotrophin receptor, p75NTR, which favors sphingomyelinase activity, ceramide production and the stabilization of  $\beta$ -site of the APP cleaving enzyme (BACE1) suggesting that A $\beta$  production depends on growth factors and the cell metabolic state [67]. Insulin-mediated PI3K/AKT signaling also regulates the phosphorylation and cellular relocalization of presenilin 1, a  $\gamma$ -secretase complex enzyme, which in turn may increase A $\beta$  production [68] (Figure 2).

In addition to the role of PI3K signaling in A $\beta$  generation, PI3K activity also contributes to the expression of biochemical alterations in the tau protein, which contains a consensus motif for AKT phosphorylation. The tau motif includes the AT100 double phospho-epitope (Thr212/Ser214), which is a specific marker for AD and other neurodegenerative tauopathies, and which also may play a specific role in AKT-mediated anti-apoptotic signaling [69]. Several studies have shown tau phosphorylation in rodents after exposure to different stressors such as food deprivation [70] or forced swimming [71]. This raises the possibility that tau phosphorylation is an integral part of the neuronal response to stressors, and that PI3K/AKT is a part of this response. On the other hand, PI3K inhibition with wortmannin leads to GSK3 $\beta$  activation, which in turn increases tau phosphorylation at specific epitopes that may contribute to the paired helicoidal filaments (PHF) formation in cortical and hippocampal neurons. This effect is reversed upon inhibition of GSK3 $\beta$  with lithium chloride [72]. Thus, decreased growth factor stimulation of PI3K signaling in aging or disease may allow increased GSK3 $\beta$  activity, leading to tau hyperphosphorylation. Interestingly, it was found that p-AKT levels and activity are decreased in AD brain specimens and that A $\beta$  interferes with AKT activation [73], which could be involved in the increase of GSK3 $\beta$  activity and tau phosphorylation.

Taking into account AD complexity and the dual role of PI3K signaling in the development of markers for AD it becomes clear that an understanding of the complex interaction between insulin signaling and insulin resistance is necessary for the development of novel drug therapies for the treatment and/or prevention of this neurodegenerative disease.

### 3.3. Insulin Resistance in Aging and AD

Insulin resistance associated with T2DM and obesity increases with aging and represents a risk for the development of cognitive deficiencies such as low perceptual speed and, in some cases, AD [74-77]. T2DM and insulin resistance are closely associated with obesity, dyslipidemia, high blood pressure, and pro-thrombotic and pro-inflammatory states. Together these factors constitute the metabolic syndrome [78]. Insulin resistance is a major pathological condition, and is often co-morbid with elevated blood pressure, cardiovascular disease, dyslipidemia, and high cholesterol levels. T2DM has been identified as a risk factor for AD, with increasing epidemiological evidence showing that T2DM almost doubles the risk of developing AD, and this risk increases when associated with cardiovascular disorders or dyslipidemia [75-77,79,80].

Aging is associated with low levels of insulin and insulin receptors in brain. Diminished cerebral insulin levels and peripheral insulin resistance appears to be accompanied with disturbances in insulin signaling in AD [81], that has led many to consider this neurodegenerative disease as an



insulin-resistant brain condition [82]. The relationship between AD and T2DM has been explored regarding central and peripheral insulin signaling, for example, in a Japanese epidemiological study demonstrating that high insulin and/or high glucose plasma levels in T2DM patients accelerate amyloid load and amyloid plaque formation in individuals with the APOE4 allele [67,77,80].

Several lines of evidence suggest that hyperglycemia is associated with cognitive impairment and with structural alterations in the brain [83,84]. Prolonged hyperglycemia, dyslipidemia and oxidative stress in diabetes, result in the increased production and accumulation of advanced glycation end products (AGEs) [80,85-88]. In addition, it was demonstrated that oxidative stress leads to activation of FOXO transcription factors through PI3K/AKT signaling pathway [89].

As mentioned, another remarkable feature of insulin action in brain is the regulation of APP metabolism. High insulin levels diminish A $\beta$  clearance, perhaps by competing for the insulin-degrading enzyme (IDE). On the other hand IDE expression is downregulated in hyperinsulinemic conditions, and is considerably diminished in AD patients with T2DM [80]. Insulin/IGF1 signaling protects synaptic dendrites from A $\beta$  oligomers injury [90].

The relevance of the insulin/PI3K pathway to the development of AD biomarkers has been studied in a mouse model of hyperinsulinemia in which systemic insulin administration promoted tau phosphorylation as shortly as 10 min after insulin administration [91]. In this sense, it has been demonstrated that insulin prevents the phosphorylation of presenilin 1 *via* PI3K/AKT and in this way regulates A $\beta$  production [92]. A $\beta$  oligomers-treated neurons exhibit elevated levels of activated PI3K, AKT and mTOR and AKT or mTOR inhibitors blocked A $\beta$  oligomers-induced aberrant neuronal cell cycle reactivation [93]. Finally, some studies in mice lacking the neuron-specific insulin receptor have shown a complete loss of insulin-mediated activation resulting in markedly reduced phosphorylation of AKT and GSK3 $\beta$ , leading to substantially increased phosphorylation of tau a hallmark of AD [94].

Liu *et al.*, have investigated the insulin/PI3K/AKT signaling pathway in the autopsied frontal cortices from AD, T2DM, T2DM-AD and control cases. They found decreased levels and activities of several components of this pathway in patients with T2DM and AD (T2DM-AD) [95]. It is of interest the recent finding that the hormone glucagon-like peptide-1 (GLP-1) facilitates insulin signaling, opening the possibility of using analogs of this hormone to improve cognition in AD [96].

A rat model was developed by using streptozotocin (STZ) to induce the brain insulin system dysfunction. STZ is a drug that selectively destroys insulin-secreting pancreatic  $\beta$  cells and thereby causes type 1 diabetes mellitus (T1DM) [97]. Insulin deficiency after systemic STZ administration reproduces some aspects of the AD-like pathology such as tau hyperphosphorylation and a reduced phosphatase activity [98-102]. Although STZ icv does not cause systemic DM it induces alterations in brain metabolic pathways being under control of the insulin signaling found in the AD's brain and aggravates the expression of AD markers in transgenic A $\beta$ PP-overexpressing mice *via* GSK3 pathway [103]. STZ is a toxic glucose analogue that diminishes ATP content, and eventually produces oxidative stress, DNA fragmentation, myelin neurotoxicity, low synthesis of acetylcholine, and cognitive impairment [97,104,106,107]. The uptake of STZ uses the glucose transporter 2 (GLUT2) to enter cells and for this reason hypothalamic neurons are particularly vulnerable to STZ [105].

#### 4. How Can the Modulation of PI3K Signaling Improve Neuronal Dysfunction in Aging and Disease?

In this review, we have described how aging is associated with changes in several transduction pathways. In particular, we have reviewed how insulin/IGF1-dependent PI3K/AKT/mTOR dysregulation is associated with abnormal cellular functions that lead to cellular stress, cellular senescence, altered neuronal plasticity, apoptosis, and cell death. The hippocampus is a nodal region in the control of neuronal reactions to stress, and is highly plastic region implicated in spatial learning and memory, which make the hippocampal circuit a particularly vulnerable brain site. Therefore, research involving PI3K modulation in this specific brain region may help to retard senescence and/or aging-related brain damage and cognitive impairments. However, the pleiotropic nature of the PI3K/AKT pathway makes its selective inhibition/activation difficult. The analysis of specific PI3K isoforms and the development of specific molecular modulators are necessary to address this problem. In this regard, there is currently work being conducted into the structural analysis of oncogenic PI3K $\alpha$  mutations as a basis for the molecular design of isozyme-specific and mutation-specific inhibitors for individualized cancer therapies [108].

There is the possibility of ameliorating some of the molecular hallmarks of AD. For example, it has been reported that the PI3K inhibitor LY294002 induces the accumulation of a highly ubiquitinated form of presenilin-1. Although the biological significance of this is not known, possible interventions into PI3K-related A $\beta$  generation therefore exist [109]. Interestingly, a recent trial with the insulin sensitizer, rosiglitazone, showed positive trends in mild-to-moderate AD patients [110].

Another important candidate for the modulation of PI3K signaling is mTOR, the downstream PI3K target. For example, inhibition of mTOR activity regulates longevity by stimulating cellular autophagy and the removal of misfolded proteins and damaged organelles, thus restoring cellular function [37,38,111]. It is interesting to note that hyperactivation of mTOR is associated with multiple degenerative diseases, autoimmune diseases, and cancer, therefore its inhibition is a reasonable strategy to combat such disorders [37].

The main mTOR inhibitor, rapamycin, is well-tolerated by humans and is interesting as an anti-aging drug. Nevertheless, it is necessary to clearly understand the role of mTOR action in normal cell functioning [37,112,113]. Rapamycin has been proposed for the treatment of neurodegenerative disorders, as it is a hydrophobic molecule that readily crosses the blood-brain barrier. Rapamycin promotes autophagy, and therefore may combat protein aggregates like tau or A $\beta$  [37]. Recently, novel catalytic inhibitors of mTOR have been designed that are synthetic small molecules that function as competitive ATP-binding inhibitors [114,115]. In addition, newly developed dual mTOR-PI3K inhibitors have been described that counteracts the PI3K/AKT overstimulation that occurs when mTOR alone is inhibited [116,117].

Another candidate to be regulated is the sirtuin system implicated in insulin/PI3K/AKT/mTOR pathway modulation. Several conditions such as caloric restriction, and exercise as well as the compound resveratrol improve insulin/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway through modulation of sirtuin content [27,42-45].

## 5. Conclusions

The modulation of molecules involved in signal transduction pathways is an emerging therapeutic option for a number of human diseases. The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway coordinates a variety of complex events that lead to changes in cell metabolism, cell growth, cell movement, and cell survival. Further studies of this pathway should be directed towards the design of new small-molecule modulators of PI3K isoforms implicated in neurodegeneration.

## Acknowledgments

Authors thank Patricia Ferrera for technical assistance. D. Heras-Sandoval is supported by CONACYT 217779. E. Ávila-Muñoz is supported by CONACYT 239696.

## References

1. van der Heide, L.P.; Ramakers, G.M.; Smidt, M.P. Insulin signaling in the central nervous system: Learning to survive. *Prog. Neurobiol.* **2006**, *79*, 205-221.
2. Engelman, J.A.; Luo, J.; Cantley, L.C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat. Rev. Genet.* **2006**, *7*, 606-619.
3. Hawkins, P.T.; Anderson, K.E.; Davidson, K.; Stephens, L.R. Signaling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem. Soc. Trans.* **2006**, *34*, 647-662.
4. Arendt, T. Synaptic plasticity and cell cycle activation in neurons are alternative effector pathways: The 'Dr. Jekyll and Mr. Hyde' concept of Alzheimer's disease or the yin and yang of neuroplasticity. *Prog. Neurobiol.* **2003**, *71*, 83-248.
5. Kimura, K.D.; Tissenbaum, H.A.; Liu, Y.; Ruvkun, G. *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **1997**, *277*, 942-946.
6. Brown-Borg, H.M.; Borg, K.E.; Meliska, C.J.; Bartke, A. Dwarf mice and the ageing process. *Nature* **1996**, *384*, 33-36.
7. Kapeller, R.; Cantley, L.C. Phosphatidylinositol 3-kinase. *Bioessays* **1994**, *16*, 565-576.
8. Vanhaesebroeck, B.; Waterfield, M.D. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp. Cell Res.* **1999**, *253*, 239-254.
9. Shin, B.C.; Suzuki, M.; Inukai, K.; Anai, M.; Asano, T.; Takata, K. Multiple isoforms of the regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) are expressed in neurons in the rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *246*, 313-319.
10. Trejo, J.L.; Pons, S. Phosphatidylinositol-3-OH kinase regulatory subunits are differentially expressed during development of the rat cerebellum. *J. Neurobiol.* **2001**, *47*, 39-50.
11. Rodgers, E.E.; Theibert, A.B. Functions of PI 3-kinase in development of the nervous system. *Int. J. Dev. Neurosci.* **2002**, *20*, 187-197.
12. Peltier, J.; O'Neill, A.; Schaffer, D.V. PI3K/AKT and CREB regulate adult neural hippocampal progenitor proliferation and differentiation. *Dev. Neurobiol.* **2007**, *67*, 1348-1361.
13. Akiyama, H.; Kamiguchi, H. Phosphatidylinositol 3-kinase facilitates microtubule-dependent membrane transport for neuronal growth cone guidance. *Biol. Chem.* **2010**, *285*, 41740-41748.

14. Bruel-Jungerman, E.; Veyrac, A.; Dufour, F.; Horwood, J.; Laroche, S.; Davis, S.; Davis, S.; Manzoni, O.J. Inhibition of PI3K-AKT signaling blocks exercise-mediated enhancement of adult neurogenesis and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e7901.
15. Horwood, J.M.; Dufour, F.; Laroche, S.; Davis, S. Signaling mechanisms mediated by the phosphoinositide 3-kinase/AKT cascade in synaptic plasticity and memory in the rat. *Eur. J. Neurosci.* **2006**, *23*, 3375-3384.
16. Sui, L.; Wang, J.; Li, B.M. Role of the phosphoinositide 3-kinase-AKT-mammalian target of the rapamycin signaling pathway in long-term potentiation and trace fear conditioning memory in rat medial prefrontal cortex. *Learn. Mem.* **2008**, *15*, 762-776.
17. Hoyer, S. The aging brain. Changes in the neuronal insulin/insulin receptor signal transduction cascade trigger late-onset sporadic Alzheimer disease (SAD). A mini-review. *J. Neural Transm.* **2002**, *109*, 991-1002.
18. Zhao, W.; Chen, H.; Xu, H.; Moore, E.; Meiri, N.; Quon, M.J.; Alkon, D.L. Brain insulin receptors and spatial memory. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 34893-34902.
19. Wang, Q.; Liu, L.; Pei, L.; Ju, W.; Ahmadian, G.; Lu, J.; Wang, Y.; Liu, F.; Wang, Y.T. Control of synaptic strength, a novel function of AKT. *Neuron* **2003**, *38*, 915-928.
20. Je, H.S.; Ji, Y.; Wang, Y.; Yang, F.; Wu, W.; Lu, B. Presynaptic protein synthesis required for NT-3-induced long-term synaptic modulation. *Mol. Brain* **2011**, *4*, 1-8.
21. Je, H.S.; Lu, Y.; Yang, F.; Nagappan, G.; Zhou, J.; Jiang, Z.; Nakazawa, K.; Lu, B. Chemically inducible inactivation of protein synthesis in genetically targeted neurons. *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 6761-6766.
22. Blagosklonny, M.V. Aging and immortality: Quasi-programmed senescence and its pharmacologic inhibition. *Cell Cycle* **2006**, *5*, 2087-2102.
23. Liang, H.; Masoro, E.J.; Nelson, J.F.; Strong, R.; McMahan, C.A.; Richardson, A. Genetic mouse models of extended lifespan. *Exp. Gerontol.* **2003**, *38*, 1353-1364.
24. Bartke, A.; Brown-Borg, H.; Mattison, J.; Kinney, B.; Hauck, S.; Wright, C. Prolonged longevity of hypopituitary dwarf mice. *Exp. Gerontol.* **2001**, *36*, 21-28.
25. Haigis, M.C.; Yankner, B.A. The aging stress response. *Mol. Cell* **2010**, *40*, 280-293.
26. Kenyon, C.J. The genetics of aging. *Nature* **2010**, *464*, 504-512.
27. Tang, B.L. Sirt1's systemic protective roles and its promise as a target in antiaging medicine. *Transl. Res.* **2011**, *157*, 276-284.
28. Collado, M.; Medema, R.H.; Garcia-Cao, I.; Dubuisson, M.L.; Barradas, M.; Glassford, J.; Rivas, C.; Burgering, B.M.; Serrano, M.; Lam, E.W. Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21960-21968.
29. Kenyon, C. The plasticity of aging: Insights from long-lived mutants. *Cell* **2005**, *120*, 449-460.
30. Morris, J.Z.; Tissenbaum, H.A.; Ruvkun, G. A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **1996**, *382*, 536-539.
31. Clancy, D.J.; Gems, D.; Harshman, L.G.; Oldham, S.; Stocker, H.; Hafen, E.; Leivers, S.J.; Partridge, L. Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science* **2001**, *292*, 104-106.

32. Taguchi, A.; Wartschow, L.M.; White, M.F. Brain IRS2 signaling coordinate life span and nutrient homeostasis. *Science* **2007**, *317*, 369-372.
33. Bartke, A. Role of the growth hormone/insulin-like growth factor system in mammalian aging. *Endocrinology* **2005**, *146*, 3718-3723.
34. Barbieri, M.; Gambardella, A.; Paolisso, G.; Varricchio, M. Metabolic aspects of the extreme longevity. *Exp. Gerontol.* **2008**, *43*, 74-78.
35. Rozing, M.P.; Westendorp, R.G.; Frölich, M.; de Craen, A.J.; Beerkman, M.; Heijmans, B.T.; Mooijaart, S.P.; Blauw, G.J.; Slagboom, P.E.; van Heemst, D. Human insulin/IGF-1 and familial longevity at middle age. *Aging* **2009**, *1*, 714-722.
36. Bonkowski, M.S.; Rocha, J.S.; Masternak, M.M.; Al Regaiey, K.A.; Bartke, A. Targeted disruption of growth hormone receptor interferes with the beneficial actions of calorie restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 7901-7905.
37. Tsang, C.K.; Qi, H.; Liu, L.F.; Zheng, X.F. Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug Discov. Today* **2007**, *12*, 112-124.
38. Arsham, A.M.; Neufeld, T.P. Thinking globally and acting locally with TOR. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2006**, *18*, 589-597.
39. Sharp, Z.D.; Bartke, A. Evidence for down-regulation of phosphoinositide 3-kinase/AKT/mammalian target of rapamycin (PI3K/AKT/mTOR)-dependent translation regulatory signaling pathways in Ames dwarf mice. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2005**, *60*, 293-300.
40. Wullschleger, S.; Loewith, R.; Hall, M.N. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **2006**, *124*, 471-484.
41. Cuervo, A.M. Autophagy: Many paths to the same end. *Mol. Cell Biochem.* **2004**, *263*, 55-72.
42. Kelly, G.S. A review of the sirtuin system, its clinical implications, and the potential role of dietary activators like resveratrol: Part 1. *Altern. Med. Rev.* **2010**, *15*, 245-263.
43. Fröjdö, S.; Durand, C.; Molin, L.; Carey, A.L.; El-Osta, A.; Kingwell, B.A.; Febbraio, M.A.; Solari, F.; Vidal, H.; Pirola, L. Phosphoinositide 3-kinase as a novel functional target for the regulation of the insulin signaling pathway by SIRT1. *Mol. Cell Endocrinol.* **2011**, *335*, 166-176.
44. Kelly, G.S. A review of the sirtuin system, its clinical implications, and the potential role of dietary activators like resveratrol: Part 2. *Altern. Med. Rev.* **2010**, *15*, 313-328.
45. Xiong, S.; Salazar, G.; Patrushev, N.; Alexander, R.W. FoxO1 mediates an autofeedback loop regulating SIRT1 expression. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 5289-5299.
46. Butterfield, D.A.; Howard, B.; Yatin, S.; Koppal, T.; Drake, J.; Hensley, K.; Aksenov, M.; Aksenova, M.; Subramaniam, R.; Varadarajan, S.; *et al.* Elevated oxidative stress in models of normal brain aging and Alzheimer's disease. *Life Sci.* **1999**, *65*, 1883-1892.
47. Mattson, M.P. Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell* **2007**, *6*, 337-350.
48. Sastre, J.; Pallardó, F.V.; Viña, J. The role of mitochondrial oxidative stress in aging. *Free Radic. Biol. Med.* **2003**, *35*, 1-8.
49. Sloane, J.A.; Hollander, W.; Moss, M.B.; Rosene, D.L.; Abraham, C.R. Increased microglial activation and protein nitration in white matter of the aging monkey. *Neurobiol. Aging* **1999**, *20*, 395-405.
50. Fubini, B.; Hubbard, A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic. Biol. Med.* **2003**, *34*, 1507-1516.

51. Golden, T.R.; Hinerfeld, D.A.; Melov, S. Oxidative stress and aging: Beyond correlation. *Aging Cell* **2010**, *1*, 117-123.
52. Papadia, S.; Soriano, F.X.; Léveillé, F.; Martel, M.A.; Dakin, K.A.; Hansen, H.H.; Kaindl, A.; Sifringer, M.; Fowler, J.; Stefovská, V.; *et al.* Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. *Nat. Neurosci.* **2008**, *11*, 476-487.
53. Galasko, D.; Montine, T. Biomarkers of oxidative damage and inflammation in Alzheimer's disease. *Biomark. Med.* **2010**, *4*, 27-36.
54. Datta, S.R.; Dudek, H.; Tao, X.; Masters, S.; Fu, H.; Gotoh, Y.; Greenberg, M.E. AKT phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **1997**, *91*, 231-241.
55. Owada, Y.; Utsunomiya, A.; Yoshimoto, T.; Kondo, H. Expression of mRNA for AKT, serine-threonine protein kinase, in the brain during development and its transient enhancement following axotomy of hypoglossal nerve. *J. Mol. Neurosci.* **1997**, *9*, 27-33.
56. Chong, Z.Z.; Kang, J.Q.; Maiese, K. AKT1 drives endothelial cell membrane asymmetry and microglial activation through Bcl-x(L) and caspases 1, 3, and 9. *Exp. Cell Res.* **2004**, *296*, 196-207.
57. Kang, J.Q.; Chong, Z.Z.; Maiese, K. Critical role for AKT1 in the modulation of apoptotic phosphatidylserine exposure and microglial activation. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *64*, 557-569.
58. Crowder, R.J.; Freeman, R.S. Phosphatidylinositol 3-kinase and AKT protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons. *J. Neurosci.* **1998**, *18*, 2933-2943.
59. Kang, J.Q.; Chong, Z.Z.; Maiese, K. AKT1 protects against inflammatory microglial activation through maintenance of membrane asymmetry and modulation of cysteine protease activity. *J. Neurosci. Res.* **2003**, *74*, 37-51.
60. Murata, H.; Sakaguchi, M.; Jin, Y.; Sakaguchi, Y.; Futami, J.; Yamada, H.; Kataoka, K.; Huh, N.H. A new cytosolic pathway from a Parkinson disease-associated kinase, BRPK/PINK1: activation of AKT via mTORC2. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 7182-7189.
61. Lu, J.; Wu, D.M.; Zheng, Z.H.; Zheng, Y.L.; Hu, B.; Zhang, Z.F. Troxerutin protects against high cholesterol-induced cognitive deficits in mice. *Brain* **2011**, *134*, 783-797.
62. Schieke, S.M.; Phillips, D.; McCoy, J.P.; Aponte, A.M.; Shen, R.F.; Balaban, R.S.; Finkel, T. The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 27643-27652.
63. Selkoe, D.J. Aging, amyloid, and Alzheimer's disease: A perspective in honor of Carl Cotman. *Neurochem. Res.* **2003**, *28*, 1705-1713.
64. Haugabook, S.J.; Le, T.; Yager, D.; Zenk, B.; Healy, B.M.; Eckman, E.A.; Prada, C.; Younkin, L.; Murphy, P.; Pinnix, I.; *et al.* Reduction of A $\beta$  accumulation in the Tg2576 animal model of Alzheimer's disease after oral administration of the phosphatidylinositol kinase inhibitor wortmannin. *FASEB J.* **2000**, *15*, 16-18.
65. Solano, D.C.; Sironi, M.; Bonfini, C.; Solerte, S.B.; Govoni, S.; Racchi, M. Insulin regulates soluble amyloid precursor protein release via phosphatidyl inositol 3 kinase-dependent pathway. *FASEB J.* **2000**, *14*, 1015-1022.

66. Gasparini, L.; Gouras, G.K.; Wang, R.; Gross, R.S.; Beal, M.F.; Greengard, P.; Xu, H. Stimulation of beta amyloid precursor protein trafficking by insulin reduces intraneuronal beta-amyloid and requires mitogen-activated protein kinase signaling. *J. Neurosci.* **2001**, *21*, 2561-2570.
67. Costantini, C.; Scoble, H.; Puglielli, L. An aging pathway controls the TrkA to p75NTR receptor switch and amyloid beta-peptide generation. *EMBO J.* **2006**, *25*, 1997-2006.
68. Maesako, M.; Uemura, K.; Kubota, M.; Ando, K.; Kuzuya, A.; Asada, M.; Kihara, T.; Kinoshita, A. Insulin regulates Presenilin 1 localization via PI3K/AKT signaling. *Neurosci. Lett.* **2010**, *483*, 157-161.
69. Ksiezak-Reding, H.; Pyo, H.K.; Feinstein, B.; Pasinetti, G.M. AKT/PKB kinase phosphorylates separately Thr212 and Ser214 of tau protein *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1639*, 159-168.
70. Yanagisawa, M.; Planel, E.; Ishiguro, K.; Fujita, S.C. Starvation induces tau hyperphosphorylation in mouse brain: Implications for Alzheimer's disease. *FEBS Lett.* **1999**, *461*, 329-333.
71. Okawa, Y.; Ishiguro, K.; Fujita, S.C. Stress-induced hyperphosphorylation of tau in the mouse brain. *FEBS Lett.* **2003**, *535*, 183-189.
72. Hernández, F.; de Barreda, E.G.; Fuster-Matanzo, A.; Goñi-Oliver, P.; Lucas, J.J.; Ávila, J. The role of GSK3 in Alzheimer disease. *Brain Res. Bull.* **2009**, *80*, 248-250.
73. Lee, H.-K.; Kumar, P.; Fu, Q.; Rosen, K.M.; Querfurth, H.W. The insulin/AKT signaling pathway is targeted by intracellular  $\beta$ -amyloid. *Mol. Biol. Cell* **2009**, *20*, 1533-1544.
74. Umegaki, H. Pathophysiology of cognitive dysfunction in older people with type 2 diabetes: Vascular changes or neurodegeneration? *Age Ageing.* **2010**, *39*, 8-10.
75. Schrijvers, E.M.; Wittman, J.C.; Sijbrands, E.J.; Hofman, A.; Koudstaal, P.J.; Breteler, M.M. Insulin metabolism and the risk of Alzheimer disease: The Rotterdam study. *Neurology* **2010**, *75*, 1982-1987.
76. Sima, A.A. Encephalopathies: The emerging diabetic complications. *Acta Diabetol.* **2010**, *47*, 279-293.
77. Matsuzaki, T.; Sasaki, K.; Tanizaki, Y.; Hata, J.; Fujimi, K.; Matsui, Y.; Sekita, A.; Suzuki, S.O.; Kanba, S.; Kiyohara, Y.; *et al.* Insulin resistance is associated with the pathology of Alzheimer disease: The Hisayama study. *Neurology* **2010**, *75*, 764-770.
78. Meigs, J.B. Invited commentary: Insulin resistance syndrome? Syndrome X? Multiple metabolic syndrome? A syndrome at all? Factor analysis reveals patterns in the fabric of correlated metabolic risk factors. *Am. J. Epidemiol.* **2000**, *152*, 908-911.
79. Whitmer, R.A.; Gunderson, E.P.; Barrett-Connor, E.; Quesenberry, C.P., Jr.; Yaffe, K. Obesity in middle age and future risk of dementia: A 27 year longitudinal population based study. *Br. Med. J.* **2005**, *330*, 1360.
80. Li, L.; Hlscher, C. Common pathological processes in Alzheimer disease and type 2 diabetes: A review. *Brain Res. Rev.* **2007**, *56*, 384-402.
81. Frolich, L.; Blum-Degen, D.; Bernstein, H.G.; Engelsberger, S.; Humrich, J.; Laufer, S.; Muschner, D.; Thalheimer, A.; Turk, A.; Hoyer, S.; *et al.* Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* **1998**, *105*, 423-438.
82. Hoyer, S. Is sporadic Alzheimer disease the brain type of non-insulin dependent diabetes mellitus? A challenging hypothesis. *J. Neural Transm.* **1998**, *105*, 415-422.

83. Gispen, W.H.; Biessels, G.J. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci.* **2000**, *23*, 542-549.
84. Biessels, G.J.; Kappelle, L.J. Increased risk of Alzheimer's disease in Type II diabetes: Insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology? *Biochem. Soc. Trans.* **2005**, *33*, 1041-1044.
85. Yamagishi, S.I. Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes. *Exp. Gerontol.* **2010**, *46*, 217-224.
86. Partridge, L.; Gems, D. Beyond the evolutionary theory of ageing, from functional genomics to evo-gero. *Trends Ecol. Evol.* **2006**, *21*, 334-340.
87. Issad, T. O-GlcNAc glycosylation and regulation of cell signaling. *Med. Sci.* **2010**, *26*, 753-759.
88. Deng, Y.; Li, B.; Liu, Y.; Iqbal, K.; Grundke-Iqbal, I.; Gong, C.X. Dysregulation of insulin signaling, glucose transporters, O-GlcNAcylation, and phosphorylation of tau and neurofilaments in the brain: Implication for Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **2009**, *175*, 2089-2098.
89. Manolopoulos, K.N.; Klotz, L.O.; Korsten, P.; Bornstein, S.R.; Barthel A. Linking Alzheimer's disease to insulin resistance: The FoxO response to oxidative stress. *Mol. Psychiatry* **2010**, *15*, 1046-1052.
90. Zhao, W.Q.; Lacor, P.N.; Chen, H.; Lambert, M.P.; Quon, M.J.; Krafft, G.A.; Klein, W.L. Insulin receptor dysfunction impairs cellular clearance of neurotoxic oligomeric A $\beta$ . *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 18742-18753.
91. Freude, S.; Plum, L.; Schnitker, J.; Leeser, U.; Udelhoven, M.; Krone, W.; Bruning, J.C.; Schubert, M. Peripheral hyperinsulinemia promotes tau phosphorylation *in vivo*. *Diabetes* **2005**, *54*, 3343-3348.
92. Maesako, M.; Uemura, K.; Kubota, M.; Ando, K.; Kuzuya, A.; Asada, M.; Kihara, T.; Kinoshita, A. Insulin regulates Presenilin 1 localization via PI3K/AKT signaling. *Neurosci. Lett.* **2010**, *483*, 157-161.
93. Bhaskar, K.; Miller, M.; Chludzinski, A.; Herrup, K.; Zagorski, M.; Lamb, B.T. The PI3K-AKT-mTOR pathway regulates A $\beta$  oligomer induced neuronal cell cycle events. *Mol. Neurodegener.* **2009**, *4*, 14.
94. Schubert, M.; Gautam, D.; Surjo, D.; Ueki, K.; Baudler, S.; Schubert, D.; Kondo, T.; Alber, J.; Galdiks, N.; Kustermann, E.; *et al.* Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 3100-3105.
95. Liu, Y.; Liu, F.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Gong, C.X. Deficient brain insulin signalling pathway in Alzheimer's disease and diabetes. *J. Pathol.* **2011**, *225*, 54-62.
96. McClean, P.L.; Parthasarathy, V.; Favire, E.; Hölscher, C. The diabetes drug liraglutide prevents degenerative processes in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **2011**, *31*, 6587-6594.
97. Szkudelski, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* **2001**, *50*, 537-546.
98. Planel, E.; Tatebayashi, Y.; Miyasaka, T.; Liu, L.; Wang, L.; Herman, M.; Yu, W.H.; Luchsinger, J.A.; Wadzinski, B.; Duff, K.E.; *et al.* Insulin dysfunction induces *in vivo* tau hyperphosphorylation through distinct mechanisms. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 13635-13648.



99. Jolival, C.G.; Lee, C.A.; Beiswenger, K.K.; Smith, J.L.; Orlov, M.; Torrance, M.A.; Masliah, E. Defective insulin signaling pathway and increased glycogen synthase kinase-3 activity in the brain of diabetic mice: Parallels with Alzheimer's disease and correction by insulin. *J. Neurosci. Res.* **2008**, *86*, 3265-3274.
100. Kim, B.; Backus, C.; Oh, S.; Hayes, J.M.; Feldman, E.L. Increased tau phosphorylation and cleavage in mouse models of type 1 and type 2 diabetes. *Endocrinology* **2009**, *150*, 5294-5301.
101. Park, S.A. A common pathogenic mechanism linking type-2 diabetes and Alzheimer's disease: Evidence from animal models. *J. Clin. Neurol.* **2011**, *7*, 10-18.
102. Grunblatt, E.; Salkovic-Petrisic, M.; Osmanovic, J.; Riederer, P.; Hoyer, S. Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *J. Neurochem.* **2007**, *101*, 757-770.
103. Plaschke, K.; Kopitz, J.; Siegelin, M.; Schliebs, R.; salkovic-Petrisic, M.; Riederer, P.; Hoyer, S. Insulin-resistant brain state after intracerebroventricular streptozotocin injection exacerbates Alzheimer-like changes in Tg2576 A $\beta$ PP-overexpressing mice. *J. Alzheimer's Dis.* **2010**, *19*, 691-704.
104. Lenzen, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* **2008**, *51*, 216-226.
105. McEwen, B.S.; Reagan, L.P. Glucose transporter expression in the central nervous system: Relationship to synaptic function. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *490*, 13-24.
106. Terwel, D.; Prickaerts, J.; Meng, F.; Jolles, J. Brain enzyme activities after intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats receiving acetyl-L-carnitine. *Eur. J. Pharmacol.* **1995**, *287*, 65-71.
107. Shoham, S.; Bejar, C.; Kovalev, E.; Weinstock, M. Intracerebroventricular injection of streptozotocin causes neurotoxicity to myelin that contributes to spatial memory deficits in rats. *Exp. Neurol.* **2003**, *184*, 1043-1052.
108. Gabelli, S.B.; Mandelker, D.; Schmidt-Kittler, O.; Vogelstein, B.; Amzel, L.M. Somatic mutations in PI3K $\alpha$ : Structural basis for enzyme activation and drug design. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1804*, 533-540.
109. Aoyagi, N.; Uemura, K.; Kuzuya, A.; Kihara, T.; Kawamata, J.; Shimohama, S.; Kinoshita, A.; Takahashi, R. PI3K inhibition causes the accumulation of ubiquitinated presenilin 1 without affecting the proteasome activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *391*, 1240-1245.
110. Risner, M.E.; Saunders, A.M.; Altman, J.F.; Ormandy, G.C.; Craft, S.; Foley, I.M.; Zvartau-Hind, M.E.; Hosford, D.A.; Roses, A.D. Efficacy of rosiglitazone in a genetically defined population with mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Pharmacogenomics J.* **2006**, *4*, 246-254.
111. Blagosklonny, M.V. Aging ROS or TOR. *Cell Cycle* **2008**, *7*, 3344-3354.
112. Wang, X.; Proud, C.G. The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology* **2006**, *21*, 362-369.
113. Harrison, D.E.; Strong, R.; Sharp, Z.D.; Nelson, J.F.; Astle, C.M.; Flurkey, K.; Nadon, N.L.; Wilkinson, J.E.; Frenkel, K.; Carter, C.S.; *et al.* Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* **2009**, *460*, 392-395.

114. Thoreen, C.C.; Kang, S.A.; Chang, J.W.; Liu, Q.; Zhang, J.; Gao, Y.; Reichling, L.J.; Sim, T.; Sabatini, D.M.; Gray, N.S. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 8023-8032.
115. Chresta, C.M.; Davies, B.R.; Hickson, I.; Harding, T.; Cosulich, S.; Critchlow, S.E.; Vincent, J.P.; Ellston, R.; Jones, D.; Sini, P.; *et al.* AZD8055 is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with *in vitro* and *in vivo* antitumor activity. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 288-298.
116. Zoncu, R.; Efeyan, A.; Sabatini, D.M. mTOR: From growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, *12*, 21-35.
117. Fan, Q.W.; Knight, Z.A.; Goldenberg, D.D.; Yu, W.; Mostov, K.E.; Stokoe, D.; Shokat, K.M.; Weiss, W.A. A dual PI3 kinase/mTOR inhibitor reveals emergent efficacy in glioma. *Cancer Cell* **2006**, *9*, 341-349.

© 2011 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

3. Heras-Sandoval, D. y Arias, C. (2009) Señalización por insulina en el cerebro y su participación en la enfermedad de Alzheimer. *El Residente*. 4(3), 117-125.

**El Residente**

ARTÍCULO DE REVISIÓN

## Señalización por insulina en el cerebro y su participación en la enfermedad de Alzheimer

David Heras-Sandoval,\* Clorinda Arias\*

**RESUMEN.** La señalización por insulina en el sistema nervioso central ha cobrado mucho interés por su participación en procesos cognoscitivos como memoria y aprendizaje y por su posible relación con padecimientos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer. En tejidos periféricos, la insulina regula principalmente el metabolismo energético y el crecimiento celular. El receptor de insulina y varios componentes de su vía de señalización se encuentran abundantemente distribuidos en el cerebro de mamíferos y su activación modula el crecimiento neuronal y la plasticidad sináptica. Se ha sugerido que algunas alteraciones en la señalización por insulina parecen ser responsables de deficiencias cognoscitivas y juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. De hecho, la diabetes de tipo II es un factor de riesgo para padecer este tipo de demencia. Recientemente se ha observado que la proteína  $\beta$ -amiloide, que se sobreproduce en la enfermedad de Alzheimer, causa alteraciones en la vía de señalización de la insulina, lo que apoya la existencia de relaciones causales interesantes entre este padecimiento y la insulina.

**Palabras clave:** Insulina, receptor de insulina, insulina cerebral, PI3K, enfermedad de Alzheimer, péptido  $\beta$ -amiloide y marañas neurofibrilares.

**ABSTRACT.** Although relatively little literature exists on the effects of insulin on the central nervous system, recently insulin signaling has attracted attention by its role in mental processes like learning and memory, and its participation on Alzheimer's disease. Insulin in brain controls food intake and modulates cognitive functions. Insulin receptors and insulin signaling pathway components have been found to be widely distributed in the mammalian brain where they regulate different cellular processes like neuronal growth and synaptic plasticity. Impaired insulin signaling has been suggested to have an important role in development of Alzheimer's disease. In fact, individuals with Alzheimer's disease have lower cerebral spinal fluid insulin and higher plasma insulin and it has been hypothesized that this may contribute to their reduced learning and memory function. Furthermore, hyperinsulinemia as well as type II diabetes mellitus are among the risk factors for Alzheimer's disease.

**Key words:** Insulin, insulin receptor, brain insulin, PI3K, Alzheimer's disease, amyloid- $\beta$  peptide and tau neurofibrillary tangles.

### Introducción

En años recientes los efectos de la insulina en el cerebro han llamado la atención por su participación en procesos mentales como la memoria y el aprendizaje.

Especial interés ha surgido sobre el papel de la insulina en desórdenes mentales como la enfermedad de Alzheimer (EA), cuya participación parece ser cada vez más documentada.<sup>1,2</sup>

El receptor de insulina (RI) se encuentra abundantemente distribuido en el cerebro de mamíferos y particularmente concentrado en las terminales sinápticas. Varios de los componentes de la vía de señalización activados por la insulina también se han encontrado en las neuronas.<sup>3</sup> Los efectos biológicos de la insulina en el cerebro dependen de la disponibilidad de la hormona en el cerebro, su unión a sus receptores y la activación de las moléculas efectoras que intervienen en la señalización intracelular de la vía.

La insulina activa proteínas involucradas en la regulación de procesos celulares, como transcripción,

\* Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Dirección para correspondencia:  
David Heras-Sandoval  
E-mail: david.herassandoval@gmail.com

Recibido: 4 de agosto del 2009  
Aceptado con modificaciones: 5 de septiembre del 2009

apoptosis, crecimiento neuronal, y plasticidad sináptica. Estos efectos son antagonizados por la actividad de fosfatasa y el equilibrio entre la actividad de fosforilación y defosforilación tiene un papel regulador en la vía de la insulina.<sup>2</sup>

La EA se ha relacionado con alteraciones en la señalización de insulina. Varios estudios epidemiológicos acerca del daño cognitivo en la EA y diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) han mostrado algunas características comunes entre las dos patologías, sugiriendo que alteraciones en la señalización por insulina podrían suceder en la EA. También se ha demostrado en múltiples modelos animales, tanto de EA como de diabetes mellitus (DM), que presentan deficiencias conductuales y de aprendizaje, que la administración de insulina mejora esta condición.<sup>1</sup>

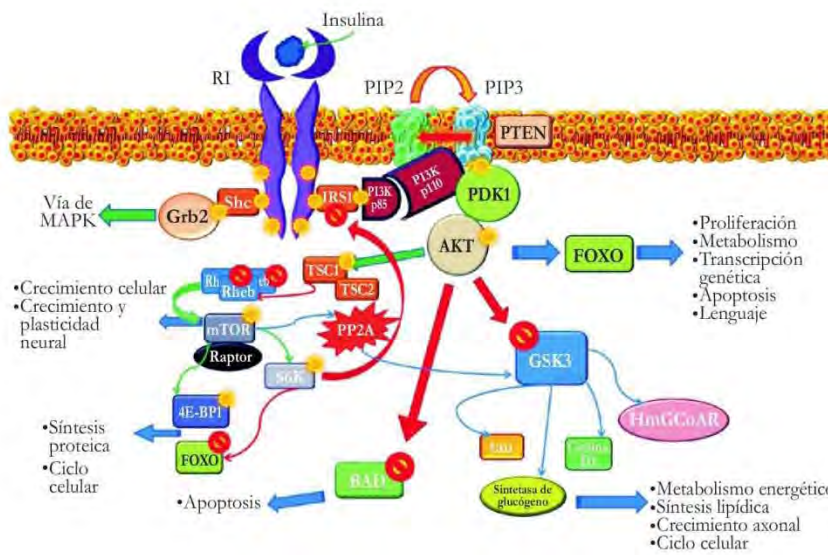
De manera importante, los receptores para insulina se encuentran presentes en las sinapsis, las estructuras que se cree son de los blancos más vulnerables en la EA.<sup>4</sup> Además, la insulina juega un papel importante en la plasticidad sináptica y la regulación de la función sináptica, sugiriéndose que la vía activada por insulina regula los procesos moleculares relacionados con el establecimiento de la memoria. De esta manera se ha propuesto que estos mismos procesos moleculares pudieran alterarse en los cerebros con EA.<sup>5,6</sup>

### La vía de señalización de insulina

La insulina ejerce varios efectos pleiotrópicos en las células: incrementa la replicación y supervivencia celular, disminuye la apoptosis y el arresto del ciclo celular, y regula la homeostasis del metabolismo energético.<sup>2</sup>

La insulina se une a su receptor, el cual es una proteína transmembranal tetramérica, la cual se compone de dos subunidades extracelulares  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$  transmembranales con actividad de tirosina cinasa. La subunidad  $\beta$  tiene tres regiones con sitios de autofosforilación. Un sitio cerca de la membrana, otro dentro del asa de regulación, y el tercero en el extremo carboxilo terminal, los cuales tienen diferentes funciones en la propagación de la señalización. La unión de la insulina induce la fosforilación en residuos de tirosina en las subunidades  $\beta\zeta$  del RI.<sup>6</sup> Una vez fosforilado, el RI atrae proteínas adaptadoras que contienen dominios de unión a fosfotirosinas (PTBs) como el sustrato del receptor de insulina (IRS) y la proteína de colágeno homóloga de Src (Shc). Las proteínas adaptadoras que se unen al receptor fosforilado pueden activar la vía de MAPK o la vía de señalización de la cinasa de fosfatidil inositol (PI3K) (Figura 1).

En la vía MAPK la proteína Shc se une al RI que a su vez promueve la unión de la proteína adaptadora



**Figura 1.** Insulina y su efecto en células no neuronales y neuronales. La insulina se une a su receptor promoviendo la autofosforilación de éste y la unión de proteínas adaptadoras como Shc e IRS1. La activación de estas proteínas promueve la unión de proteínas cinasas que transducen la señal río abajo a sus proteínas blanco, promoviendo los efectos relacionados a la insulina. Flechas verdes (activación), flechas rojas (inactivación), flechas azules (regulación).

Grb2, la cual activa a la vía de MAPK, lo que lleva a la activación de las proteínas cinasas Erk1 y Erk2 al fosforilar la treonina 202 y la tirosina 204 respectivamente.<sup>7,8</sup>

A pesar de que la insulina puede activar tanto la vía de la cinasa MAPK como la de PI3K, la vía de PI3K es la que se encuentra frecuentemente involucrada con los efectos producidos por la insulina, y es por lo tanto la vía principal de acción de la hormona.

En la vía de PI3K las proteínas sustrato del RI, como IRS1 e IRS2, se unen a las tirosinas fosforiladas del RI y son activadas de manera que pueden unir el dominio homólogo a Src 2 (SH2) de la PI3K de la clase IA, el cual se une a residuos de fosfotirosina en los receptores activados y proteínas adaptadoras. Tanto el IRS1 como el IRS2 pueden estimular la fosforilación del RI dependiendo de la afinidad de las proteínas sustrato para el RI, la concentración de la proteína sustrato, la compartimentalización celular del RI, y el contexto celular, de manera que la actividad de cinasa del RI se incrementa activando componentes río abajo.<sup>7</sup>

La unión de PI3K a fosfotirosinas en las proteínas sustrato del RI permite la liberación de la subunidad p85 de PI3K que se encuentra inhibida por la subunidad p110 de PI3K. Así el heterodímero p85-p110 se puede unir a su sustrato fosfatidil inositol -4, 5- bifosfato (PIP2) en la membrana plasmática y producir fosfatidil inositol -3, 4, 5-trifosfato (PIP3). En ausencia de señal p85 estabiliza a p110 e inhibe su actividad de cinasa. Pero esta actividad es contrarrestada por la proteína fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN) la cual hidroliza PIP3 a PIP2 actuando como un antagonista catalítico de PI3K<sup>2</sup> (Figura 1).

La síntesis de PIP3 lleva al reclutamiento de cinasas de serina/treonina, como Akt, que tiene un dominio homólogo de pleckstrina (PHD) el cual se puede unir a lípidos de fosfatidil inositol en las membranas celulares. Akt es fosforilada por PDK1 en el residuo de treonina 308 y serina 473 activando Akt, la cual actúa sobre varias proteínas jugando un papel muy importante en procesos como la síntesis proteica, crecimiento y metabolismo celular, plasticidad neuronal y apoptosis. Akt puede regular la síntesis proteica al fosforilar proteínas FOXO que son factores de transcripción miembros de la familia «Forkhead», los cuales se unen a DNA, y promueven la transcripción de genes que regulan el desarrollo de órganos, adquisición del lenguaje, y metabolismo.<sup>9-12</sup>

Una vez que Akt es activada actúa sobre el complejo de las proteínas de esclerosis tuberal 1 y 2 (TSC1-TSC2) y lo activa; a su vez el complejo inhibe la actividad de GTPasa de Rheb. Rheb se acumula y activa al complejo de la cinasa blanco de rapamicina de mamífero (mTOR)- RAPTOR lo cual fosforila a la proteína 1 de unión al factor eucarionte de inicio de la traducción 4E (4E-BP1) y a la cinasa p70S6 (p70S6K) regulando negativamente la familia de factores de la transcripción FOXO al promover su translocación del núcleo al citoplasma donde es inactivado por proteínas 14-3-3.<sup>2,8,13</sup>

A su vez, FOXO regula la transcripción de la proteína p27Kip1, una proteína que inhibe la progresión del ciclo celular en fibroblastos de embriones de ratón. La activación de Akt promueve la transición del ciclo celular de la fase G1 a la S al bloquear la transcripción de p27Kip1 a través de FOXO. FOXO también media la transcripción de varias proteínas pro-apoptóticas, como el ligando de Fas (Fas-L) y la proteína pro-apoptótica Bim. El bloqueo de la transcripción de FOXO produce a su vez efectos anti-apoptóticos. Más aún, Akt puede fosforilar directamente p27Kip1 y el antagonista de BCL2 de muerte celular (BAD), lo que lleva a su inactivación al unirse con proteínas 14-3-3.<sup>13-15</sup> Akt también puede actuar sobre la cinasa de la sintetasa de glucógeno 3 (GSK3) regulando la progresión del ciclo celular, crecimiento axonal en astrocitos y neuronas, y transporte axonal al regular la fosforilación de proteínas como la ciclina D1 y la unión a microtúbulos de proteínas como MAP1B y tau.<sup>16</sup>

La vía de señalización de insulina puede ser regulada por la acción de cinasas que se comunican con otras vías de señalización inducidas por hormonas o factores de crecimiento y nutricionales, o por mutaciones en genes de las proteínas involucradas en la vía de señalización de la insulina. Cinasas como mTOR, JNK, p70S6K, y PKC $\theta$  pueden regular la fosforilación del IRS1 y promover su degradación por el proteasoma. Además mTOR puede regular la actividad de la fosfatasa de proteínas 2A (PP2A) y de esa manera regular los estados de fosforilación y defosforilación de GSK3 en la serina 9. La activación prolongada de Akt produce su fosforilación en la serina 473, la cual inhibe la señalización por insulina. Así mismo, PTEN puede actuar sobre PIP3 y de esa

manera contrarrestar la acción de PI3K y la transducción de la señal.<sup>2,6,17</sup>

### Señalización por insulina en el cerebro

La insulina en el cerebro juega un papel muy importante en la regulación del metabolismo, y alteraciones en su actividad se relacionan directamente con enfermedades metabólicas, tales como obesidad, diabetes o síndrome metabólico. En el cerebro de mamíferos, la insulina tiene efectos anorexigénicos, induce pérdida de peso corporal y regula el control hipotalámico sobre la ingesta de alimentos. También regula la homeostasis de la glucosa periférica al estimular las neuronas productoras de pro-opiomelancortina (POMC) y de péptido relacionado con Agouti (AgRP) a través de la vía del IR y PI3K.<sup>8,18</sup>

La insulina cerebral puede generarse en diferentes sitios. Se sabe que la insulina se produce en las células  $\beta$  del páncreas y que puede entrar al cerebro a través de la barrera hematoencefálica por transporte activo mediado por el RI.<sup>6,8</sup> También se ha demostrado la presencia de RNA mensajero en neuronas del cerebro mamífero, lo que sugiere que la insulina puede ser producida localmente. Así mismo, se ha observado una estricta regulación de los niveles de insulina y de su receptor en el cerebro, lo cual puede sugerir que los niveles de insulina en el cerebro no dependen exclusivamente de los de la periferia. Sin embargo, si el origen de la insulina cerebral es local, periférico o compartido, aún no se ha esclarecido.<sup>6,19,20</sup>

El RI es muy abundante en los cerebros de roedores y humanos con mayor concentración en el bulbo olfatorio, el hipotálamo, la glándula pituitaria, el hipocampo, la corteza cerebral y el cerebelo. Además, la mayoría de las proteínas de la vía de señalización de insulina tienen patrones de expresión que se superponen con el RI en el cerebro.<sup>6,8,20,21</sup>

El RI se localiza abundantemente en el hipocampo y su expresión se incrementa después de tareas de aprendizaje espacial en roedores. El RI se encuentra ampliamente en las sinapsis de los árboles dendríticos donde regula la liberación de neurotransmisores y el reclutamiento de receptores.<sup>22</sup> Algunas revisiones sugieren que la insulina regula receptores glutamatérgicos y GABAérgicos, a través de la activación de la vía PI3K y MAPK. Así mismo, también se sabe que

los procesos de potenciación a largo plazo (LTP) y de depresión a largo plazo (LTD), que se asocian con los eventos moleculares que subyacen al establecimiento de la memoria y aprendizaje, están regulados por la activación de PI3K a través de la formación de complejos con receptores NMDA, donde PI3K regula translocación de los receptores NMDA a la membrana. Finalmente, la respuesta del RI se reduce por la acción del glutamato y la despolarización, lo que probablemente involucra entrada de calcio  $Ca^{2+}$  y activación de cinasas dependientes de  $Ca^{2+}$ . Lo anterior indica un posible papel de la insulina en la plasticidad sináptica y la modulación de la actividad neuronal.<sup>5,6,21,23</sup>

La presencia de los componentes de la vía en regiones postsinápticas, tal como mTOR, p70S6K, eIF-4E, 4E-BP1 y 4EBP2 sugieren que hay regulación de la síntesis de proteínas en las sinapsis. La insulina regula los niveles de la proteína de la densidad postsináptica PSD-95, la cual se une con los receptores para NMDA en la membrana sináptica, a través de la activación de mTOR y la modulación de la traducción de proteínas en las sinapsis.<sup>24</sup> Más aún, mTOR modula la plasticidad sináptica por estimulación por el factor neuronal derivado del cerebro (BDNF) y niveles de AMP cíclico (cAMP) donde se requiere nueva síntesis de proteínas para la inducción de una LTP duradera mediada por neurotrofinas.<sup>25</sup> Así, la insulina no sólo modula la actividad sináptica y neuronal modificando la actividad de la vía, sino posiblemente produciendo/manteniendo proteínas claves en la función y estructura sináptica.

### Alteración de la vía de señalización de insulina y sus efectos en tejidos no neuronales y neuronales

Son varios los factores que pueden interferir con la señalización apropiada de la insulina en diferentes niveles celulares; ya sea interfiriendo con la actividad del receptor en la membrana celular (como el cortisol), al alterar las propiedades de la membrana (niveles de omega 3 reducidos, producción de PIP3, etc.) o al interactuar con moléculas de la vía de señalización (por ejemplo las fosfatasa). La pérdida de la señalización de insulina puede desembocar en una afec-

ción general de la regulación metabólica y de la función neural en el cerebro.<sup>23,26,27</sup>

Las alteraciones del funcionamiento del RI periférico se caracterizan por una habilidad reducida de la insulina para estimular la utilización de la glucosa (resistencia a insulina), un síndrome que se asocia con DMT2, hipertensión y obesidad. En ciertas formas hereditarias de resistencia a insulina hay un decremento de los niveles de RI y la función del RI es defectuosa.<sup>6</sup> Los ratones que carecen de RI cerebral consumen más alimento, tienen obesidad inducida por la dieta, mayor grasa corporal y concentraciones de leptina en plasma, resistencia a insulina moderada, niveles de insulina en plasma elevados, hipertrigliceridemia y funciones reproductivas alteradas.<sup>21</sup>

La supresión de la actividad enzimática del receptor se ha relacionado con factores de regulación negativa estimulados por la misma vía de señalización del RI, así como de otras vías. La activación constante de este ciclo de retroalimentación negativa se sabe que es causado por estrés oxidante y factores proinflamatorios que contribuyen al desarrollo de la resistencia a insulina en tejidos periféricos.<sup>6</sup>

Además se ha observado que la fosforilación del IRS1 en residuos de serina 636/639 por mTOR afecta la señalización por insulina al dañar la activación de PI3K y debido a la redistribución subcelular del complejo IRS1/PI3K en el citoplasma.<sup>28</sup> También la elevación en la actividad de fosfatasa de tirosina atenúa la actividad de cinasa de tirosinas del RI, mientras que la fosforilación de ciertos residuos de treonina y serina dentro del receptor inhibe de manera conformacional la capacidad de la fosforilación de residuos de tirosina.<sup>6</sup>

Se ha visto que los factores nutricionales modifican también la respuesta a la estimulación por insulina. Por ejemplo, se ha demostrado que los niveles bajos de ácido docosahexanoico (DHA), un ácido graso omega-3, producen un decremento en la señalización a través de PI3K en neuronas de ratones transgénicos. Los niveles de DHA modifican los niveles de fosfatidil serina en las membranas celulares, facilitando la translocación y activación de Akt, y previniendo la apoptosis. El DHA se encuentra de manera abundante en las sinapsis neuronales y los bajos niveles de DHA incrementan la tasa de omega-6/omega-3, lo que produce estrés oxidante e inflama-

ción, potenciando la producción de péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A).<sup>27,29</sup>

También la exposición de neuronas entéricas primarias a dosis elevadas de glucosa por 24 horas resulta en un incremento significativo de la apoptosis.<sup>30</sup> La glucosa en altas concentraciones incrementa la producción de ATP y reduce la tasa de AMP/ATP e inhibe la actividad de la cinasa dependiente de AMP, desinhibe mTOR, previene la fosforilación del RI y la producción de óxido nítrico en neuronas del hipotálamo.<sup>31</sup>

Las dietas altas en grasas producen resistencia a insulina en tejidos periféricos al alterar la capacidad de la insulina para activar la vía IRS/PI3K.<sup>20</sup> Por otro lado, la activación de mTOR y p70S6K es acelerada por la insulina en tejido de ratas obesas, lo que incrementa la fosforilación del IRS1 en residuos serina 636 y serina 639, alterando la activación de Akt.<sup>32</sup> La pérdida de la regulación de la señalización de insulina por mTOR puede generar también resistencia a insulina y pérdida de la señal, como muestran los pacientes tratados con rapamicina, un inhibidor de mTOR.<sup>33</sup> Es frecuente encontrar estrés oxidante en obesidad, lo que puede causar fosforilación del residuo de serina 307 y serina 632 del IRS1, lo cual se ha asociado con la activación de la cinasa  $\beta$  del inhibidor  $\kappa$  (IKK $\beta$ ) y la cinasa c-Jun (JNK), aunque se ha demostrado que la sola fosforilación de IRS1 en la serina 307 afecta la señalización de insulina.<sup>34</sup> Esta fosforilación previene la activación de PI3K. En estados de resistencia a insulina hereditarios se ha observado sobreexpresión de la subunidad p85 de PI3K y mutaciones puntuales en el gen Akt2.<sup>13</sup> Finalmente, la desregulación de algunos de los componentes de la vía pueden llevar al desarrollo de cáncer y se ha encontrado que GSK3  $\beta$  regula los factores de transcripción c-Jun y c-Myc relacionados con la producción de cáncer.<sup>2</sup>

### Regulación de la señalización de insulina en la EA

La EA es la mayor causa de demencia en el mundo y se caracteriza por depósitos de  $\beta$ A en el parénquima cerebral y marañas de proteína tau (de unión a microtúbulos) intraneuronales.<sup>35</sup>

Varios estudios han señalado la importancia de la señalización de insulina en alteraciones como la EA

indicando cierta relación entre la resistencia a insulina de la DMT2 y la EA. Los pacientes con EA presentan características comparables con las encontradas en pacientes con resistencia a insulina y diabetes, como son la elevada concentración de insulina en plasma en condiciones de ayuno y baja concentración de insulina en el líquido cefalorraquídeo, lo que indica alteraciones de la homeostasis hormonal. Además, los pacientes con DMT2 muestran a su vez algunas deficiencias cognitivas. Así mismo, modelos de ratones transgénicos que desarrollan depósitos elevados de  $\beta A$  o ratas diabéticas tratadas con estreptozocina, un agente tóxico que daña la producción de insulina al destruir las células  $\beta$  del páncreas, presentan hiperinsulinemia y daño cognoscitivo.<sup>1,6,21,36,37</sup> Lo anterior muestra que la alteración en los niveles de insulina puede tener un papel importante en el daño cognoscitivo producido en EA.

Las alteraciones en la señalización de insulina en el cerebro pueden afectar la composición lipídica de las membranas celulares, el metabolismo del colesterol, la tasa de ATP/AMP, y el estado de óxido-reducción celular. Lo anterior afecta el metabolismo de la proteína precursora del péptido  $\beta A$  (APP), que es cortada por las secretasas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , así como el estado de fosforilación de la proteína tau, regulado por GSK3 $\beta$ . Además se ha visto que los productos de la APP y los oligómeros de la proteína tau regulan negativamente la vía de señalización de insulina, lo que puede producir un círculo vicioso en el que las alteraciones metabólicas producen más  $\beta A$  e hiperfosforilación de tau, alterando aún más la regulación metabólica.<sup>21,23,38</sup>

También se ha visto que el ambiente lipídico regula el procesamiento de la APP y la actividad de las secretasas, como se ha visto con DHA, el cual favorece el procesamiento de la APP, modulando la actividad de las secretasas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , suprimiendo la actividad de la isoforma  $\alpha$  de GSK3 y disminuyendo los niveles de  $\beta A$ .<sup>27</sup> Las presenilinas (PS1 o PS2), que forman parte del complejo de la secretasa  $\gamma$ , median el metabolismo de lípidos de membrana, tal como la producción de colesterol y síntesis de esfingomielina y a su vez los niveles de esfingomielina regulan la actividad de las presenilinas, creando otro ciclo de retroalimentación negativa que juega un papel importante en la modulación de la señalización de la vía de insuli-

na. También el  $\beta A$  interactúa con las esfingomielinasas y la reductasa del 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA (HMGCoAR) modulando la síntesis de colesterol celular y los niveles de esfingomielina<sup>27,39</sup> (Figura 2).

Otro factor que influye en la señalización de insulina es el  $\beta A$ , el cual compete con la insulina por la unión a la enzima degradadora de insulina (IDE), de manera que altas concentraciones de insulina en la sangre disminuyen la eliminación de  $\beta A$  promoviendo la producción de placas de amiloide.<sup>5</sup> Así mismo, el  $\beta A$  compete con la insulina por el RI y altera su función al dañar la activación de la MAPK, la proteína cinasa dependiente de calcio calmodulina, Akt y el establecimiento de la LTP, sin embargo no se sabe de qué manera se une el  $\beta A$  al RI y la IDE. La inhibición persistente de estas vías en el cerebro durante el desarrollo de la EA está involucrada en la alteración de la plasticidad sináptica y afecta la arquitectura de las espinas dendríticas<sup>40</sup> (Figura 2).

El fragmento  $\alpha$  soluble cortado de la APP por la secretasa  $\alpha$  (sAPP $\alpha$ ) también puede activar la vía de PI3K y MAPK, regulando la supervivencia neuronal, evitando la apoptosis y modulando la plasticidad sináptica.<sup>41</sup> También los ligandos difusibles derivados del  $\beta A$  (ADDLs) se pueden unir a neuronas y preparaciones de sinaptosomas corticales, dañar la homeostasis del calcio e inhibir la activación del RI, lo que lleva al establecimiento de resistencia a insulina.<sup>6,42</sup>

La señalización por insulina modula la actividad de GSK3, que a su vez regula la fosforilación de tau y su unión a microtúbulos. Cuando la regulación de GSK3 por la insulina se pierde, tau es hiperfosforilada y forma agregados fibrilares. La tau fosforilada parece ser más resistente a proteólisis y tiende a acumularse dentro de las neuronas, formando pequeños oligómeros que son tóxicos para la neurona.<sup>36,43</sup>

Así, la presencia del RI en las sinapsis de áreas comprometidas en la EA y los diferentes estudios sobre la acción y regulación de la vía en el cerebro sugieren que las sinapsis y su disfunción observada en la EA pueden estar sujetas a la regulación de la vía de insulina. Se sabe que la APP y sus derivados están presentes en grandes cantidades y son transportados a las terminales sinápticas<sup>41,44</sup> y que los pequeños oligómeros de  $\beta A$  y los ADDLs son secretados en las terminales sinápticas, lo que puede dañar la función



del hipocampo y producir deficiencias en memoria posiblemente al interactuar con el RI u otros receptores de neurotransmisores (Figura 2).

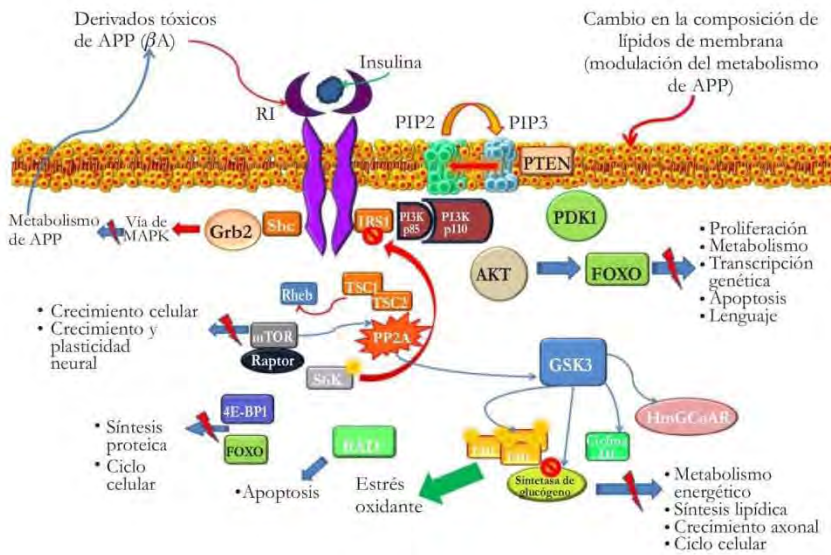
### Modulación de la vía de insulina contra el daño producido en la EA

Diferentes estrategias se pueden proponer para prevenir las características de la EA relacionadas con la disfunción de la vía de señalización de insulina. Un factor importante es la transducción de la señal a través de Akt. La actividad de Akt puede ser mejorada con niveles apropiados de omega-3 como el DHA, lo que puede ayudar a disminuir los niveles de  $\beta A$  y la carga de amiloide, como se ha observado en ratones transgénicos Tg2576 al regular la actividad de la enzima IDE.<sup>27</sup> La pérdida de la inhibición de GSK3 está implicada en la producción de marañas neurofibrilares y la agregación de tau, lo cual genera estrés oxidante, daño en las sinapsis y toxicidad neuronal, por lo que inhibidores de GSK3 podrían ser usados para prevenir la hiperfosforilación de tau y la producción de marañas neurofibrilares. La insulina ha sido usada para mejorar la memoria y el aprendizaje en sujetos sanos y también en tareas conductuales en ratas, sugiriendo algún papel en el mejoramiento de la memoria en humanos; sin embargo, los efectos reales

de la insulina sobre el SNC apenas están siendo dilucidados.<sup>45,46</sup> Dentro de los compuestos que se han propuesto como agentes reductores de la carga de  $\beta A$  se cuentan las estatinas, que disminuyen los niveles de colesterol, algunos péptidos que previenen la formación de fibrillas de  $\beta A$  como NC-531 y PBT-1 (un quelante de metales) y moduladores de la actividad de las secretasas como Bryostatín. Finalmente, el uso de antioxidantes, como la vitamina E, han mostrado eficacia para contrarrestar los efectos del estrés oxidante producido en la EA.<sup>35</sup>

### Discusión

Aunque el papel de la insulina en el sistema nervioso central (SNC) aún está siendo develado, se sabe que la insulina regula el ciclo celular, proliferación, crecimiento y función sináptica en el tejido neuronal. Los procesos regulados por la insulina involucran la actividad de cinasas y fosfatasa sobre enzimas que actúan sobre la expresión o actividad de sus proteínas blanco. El balance entre estas actividades es necesario para la función celular adecuada. De manera importante, la insulina en el SNC regula la función sináptica y varios procesos relacionados con memoria y aprendizaje, por lo que conocer su funcionamiento y su papel en la modulación de la actividad neuronal es



**Figura 2.** Alteraciones propuestas de la vía de insulina en la enfermedad de Alzheimer. La disfunción en la transducción de la señal de insulina a partir del RI, evita la actividad de PI3K y la activación de los múltiples blancos de Akt, lo que conduce a la pérdida de la homeostasis celular. En la EA estos cambios modulan la producción de péptido  $\beta A$  y marañas neurofibrilares de tau. La producción de  $\beta A$  y marañas neurofibrilares producen daño tóxico y modifican la señalización de la vía haciendo progresivo el daño. Rayos rojos (alteración o daño).

importante en lo que atañe al tratamiento de las patologías degenerativas. La señalización intraneuronal por insulina se ha visto alterada en modelos animales de diabetes y de EA, siendo un factor importante en la disfunción cognoscitiva observada en ambas patologías. De manera interesante, la disfunción de la señalización de la insulina puede modular el procesamiento del  $\beta$ A y la formación de las marañas neurofibrilares, las cuales son características histopatológicas de la EA. Así, corrigiendo aspectos moleculares de la señalización por insulina se podría ayudar a preservar ciertas funciones neuronales y favorecer la supervivencia neuronal en condiciones patológicas. La insulina puede ayudar a mantener una homeostasis adecuada del metabolismo celular y ayudar a prevenir la aparición de agentes tóxicos en la EA. Algunas estrategias han sido sugeridas para evitar

los estragos producidos por la EA, como es la modificación de los niveles de lípidos involucrados en la regulación de la vía de insulina y del metabolismo de la APP, así como moduladores de la actividad de enzimas involucradas en la formación de  $\beta$ A y marañas neurofibrilares.

En conjunto, las evidencias presentadas sugieren un impacto importante del papel de la insulina en el SNC que favorece la sinaptogénesis, incrementa la memoria, reduce la fisiopatología del Alzheimer y puede estimular la neurorreparación.

### Agradecimientos

El presente trabajo fue posible gracias al apoyo de CONACyT y del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, México, D.F., México.

### Bibliografía

1. Watson G, Craft S. Modulation of memory by insulin and glucose: neuropsychological observations in Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* 2004; 490(1-3): 97-113.
2. Zhao L, Vogt P. Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene* 2008; 27(41): 5486-5496.
3. Abbott MA, Wells DG, Fallon JR. The insulin receptor tyrosine kinase substrate p58/53 and the insulin receptor are components of CNS synapses. *J Neurosci* 1999; 19(17): 7300-7308.
4. Selkoe D. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 2002; 298(5594): 789-791.
5. Man HY, Wang Q, Lu WY, Ju W, Ahmadian G, Liu L, D'Souza S, Wong TP, Taghibiglou C, Lu J, Becker LE, Pei L, Liu F, Wymann MP, MacDonald JF, Wang YT. Activation of PI3-Kinase is required for AMPA receptor insertion during LTP of mEPSCs in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 2003; 38(4): 611-624.
6. Zhao WQ, De Felice FG, Fernández S, Chen H, Lambert MP, Quon MJ, Krafft GA, Klein WL. Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. *FASEB J* 2008; 22(1): 246-260.
7. Niessen M, Jaschinski F, Item F, McNamara MP, Spinas GA, Trüb T. Insulin receptor substrates 1 and 2 but not Shc can activate the insulin receptor independent of insulin and induce proliferation in CHO-IR cells. *Exp Cell Res* 2007; 313(4): 805-815.
8. Plum L, Belgardt BF, Brüning JC. Central insulin action in energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest* 2006; 116(7): 1761-1766.
9. Accili D, Arden KC. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell* 2004; 117(4): 421-426.
10. Burgering BM, Kops GJ. Cell cycle and death control: long live Forkheads. *Trends Biochem Sci* 2002; 27(7): 352-360.
11. Greer EL, Brunet A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 2005; 24(50): 7410-7425.
12. Kenyon C. The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell* 2005; 120(4): 449-460.
13. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 2006; 7(8): 606-619.
14. Collado M, Medema RH, Garcia-Cao I, Dubuisson ML, Barradas M, Glassford J, Rivas C, Burgering BM, Serrano M, Lam EW. Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1. *J Biol Chem* 2000; 275(29): 21960-21968.
15. Linseman DA, Phelps RA, Bouchard RJ, Le SS, Laessig TA, McClure ML, Heidenreich KA. Insulin-like growth factor-I blocks Bcl-2 interacting mediator of cell death (Bim) induction and intrinsic death signaling in cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 2002; 22(21): 9287-9297.
16. Jope RS, Johnson GV. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* 2004; 29(2): 95-102.
17. Meske V, Albert F, Ohm TG. 2008, Coupling of mammalian target of rapamycin with phosphoinositide 3-kinase signaling pathway regulates protein phosphatase 2A- and glycogen synthase kinase-3-dependent phosphorylation of tau. *J Biol Chem* 2008; 283(1): 100-109.
18. Pardini AW, Nguyen HT, Figlewicz DP, Baskin DG, Williams DL, Kim F, Schwartz MW. Distribution of insulin receptor substrate-2 in brain areas involved in energy homeostasis. *Brain Res* 2006; 1112(1): 169-178.

19. Havrankova J, Roth J, Brownstein MJ. Concentrations of insulin and insulin receptors in the brain are independent of peripheral insulin levels studies of obese and streptozotocin-treated rodents. *J Clin Invest* 1979; 64(2): 636-642.
20. Gerozissis K. Brain insulin, energy and glucose homeostasis; genes, environment and metabolic pathologies. *Eur J Pharmacol* 2008; 585(1): 38-49.
21. Gasparini L, Netzer WJ, Greengard P, Xu H. Does insulin dysfunction play a role in Alzheimer's disease? *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23(6): 288-293.
22. Wei Y, Williams JM, Dipace C, Sung U, Javitch JA, Galli A, Saunders C. Dopamine transporter activity mediates amphetamine-induced inhibition of Akt through a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II-dependent mechanism. *Mol Pharmacol* 2007; 71(3): 835-842.
23. Nelson T, Alkon D. Insulin and cholesterol pathways in neuronal function, memory and neurodegeneration. *Biochem Soc Trans* 2005; 33(Pt 5): 1033-1036.
24. Lee CC, Huang CC, Wu MY, Hsu KS. Insulin stimulates postsynaptic density-95 protein translation via the phosphoinositide 3-kinase-akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway. *J Biol Chem* 2005; 280(18): 18543-18550.
25. Tang SJ, Reis G, Kang H, Gingras AC, Sonenberg N, Schuman EM. A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(1): 467-472.
26. Hoyer S. Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease. *Eur J Pharmacol* 2004; 490(1-3): 115-125.
27. Lim GP, Calon F, Morihara T, Yang F, Teter B, Ubeda O, Salem N Jr, Frautschy SA, Cole GM. A diet enriched with the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid reduces amyloid burden in an aged Alzheimer mouse model. *J Neurosci* 2005; 25(12): 3032-3040.
28. Tremblay F, Gagnon A, Veilleux A, Sorisky A, Marette A. Activation of the mammalian target of rapamycin pathway acutely inhibits insulin signaling to Akt and glucose transport in 3T3-L1 and human adipocytes. *Endocrinology* 2005; 146(3): 1328-1337.
29. Akbar M, Calderón F, Wen Z, Kim HY. Docosahexaenoic acid: A positive modulator of Akt signaling in neuronal survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(31): 10858-10863.
30. Anitha M, Gondha C, Sutliff R, Parsadanian A, Mwangi S, Sitaraman SV, Srinivasan S. GDNF rescues hyperglycemia-induced diabetic enteric neuropathy through activation of the PI3K/Akt pathway. *J Clin Invest* 2006; 116(2): 344-356.
31. Canabal DD, Potian JG, Durán RG, McArdle JJ, Routh VH. Hyperglycemia impairs glucose and insulin regulation of nitric oxide production in glucose-inhibited neurons in the ventromedial hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 293(2): R592-600.
32. Khamzina L, Veilleux A, Bergeron S, Marette A. Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: Possible Involvement in Obesity-Linked Insulin Resistance. *Endocrinology* 2005; 146(3): 1473-1481.
33. Di Paolo S, Teutonico A, Leogrande D, Capobianco C, Schena PF. Chronic inhibition of mammalian target of rapamycin signaling downregulates insulin receptor substrates 1 and 2 and AKT activation: A crossroad between cancer and diabetes? *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(8): 2236-2244.
34. Bloch-Damti A, Potashnik R, Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF, Rudich A, Bashan N. Differential effects of IRS1 phosphorylated on Ser307 or Ser632 in the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Diabetologia* 2006; 49(10): 2463-2473.
35. Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet* 2006; 368(9533): 387-403.
36. Ho L, Qin W, Pompl PN, Xiang Z, Wang J, Zhao Z, Peng Y, Cambareli G, Rocher A, Mobbs CV, Hof PR, Pasinetti GM. Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J* 2004; 18(7): 902-904.
37. Lannert H, Hoyer S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav Neurosci* 1998; 112(5): 1199-1208.
38. Hoyer S. Is sporadic Alzheimer disease the brain type of non-insulin dependent diabetes mellitus? A challenging hypothesis. *J Neural Transm* 1998; 105(4-5): 415-422.
39. Grimm MO, Grimm HS, Pätzold AJ, Zinser EG, Halonen R, Duering M, Tschäpe JA, De Strooper B, Müller U, Shen J, Hartmann T. Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid- $\beta$  and presenilin. *Nat Cell Biol* 2005; 7(11): 1118-1123.
40. Townsend M, Mehta T, Selkoe DJ. Soluble A $\beta$  inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway. *J Biol Chem* 2007; 282(46): 33305-33312.
41. Cheng G, Yu Z, Zhou D, Mattson MP. Phosphatidylinositol-3-Kinase-akt kinase and p42/p44 mitogen-activated protein kinases mediate neurotrophic and excitoprotective actions of a secreted form of amyloid precursor protein. *Exp Neurol* 2002; 175(2): 407-414.
42. Mungarro-Menchaca X, Ferrera P, Morán J, Arias C.  $\beta$ -amyloid peptide induces ultrastructural changes in synaptosomes and potentiates mitochondrial dysfunction in the presence of ryanodine. *J Neurosci Res* 2002; 68(1): 89-96.
43. Avila J. Tau phosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease pathology. *FEBS Lett* 2006; 580(12): 2922-2927.
44. Lazarov O, Lee M, Peterson DA, Sisodia SS. Evidence that synaptically released  $\beta$ -amyloid accumulates as extracellular deposits in the hippocampus of transgenic mice. *J Neurosci* 2002; 22(22): 9785-9793.
45. Kern W, Peters A, Fruehwald-Schultes B, Deininger E, Born J, Fehm HL. Improving influence of insulin on cognitive functions in humans. *Neuroendocrinology* 2001; 74(4): 270-280.
46. Park CR, Seeley RJ, Craft S, Woods SC. Intracerebroventricular insulin enhances memory in a passive-avoidance task. *Physiol Behav* 2000; 68(4): 509-514.